(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号
特許第5770631号
（Ｐ５７７０６３１）
(45)発行日　平成27年8月26日(2015.8.26)　(24)登録日　平成27年7月3日(2015.7.3)

(51)Int.Cl.　　F I
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)　Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ａ０１Ｈ　5/00　(2006.01)　Ａ０１Ｈ　5/00　Ａ
Ａ０１Ｎ　41/10　(2006.01)　Ａ０１Ｎ　41/10　Ａ
Ａ０１Ｎ　43/40　(2006.01)　Ａ０１Ｎ　43/40　１０１Ｅ
Ａ０１Ｎ　43/90　(2006.01)　Ａ０１Ｎ　43/90　１０３
請求項の数12　（全77頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-526554(P2011-526554)
(86)(22)出願日　平成21年9月14日(2009.9.14)
(65)公表番号　特表2012-502624(P2012-502624A)
(43)公表日　平成24年2月2日(2012.2.2)
(86)国際出願番号　PCT/GB2009/002188
(87)国際公開番号　WO2010/029311
(87)国際公開日　平成22年3月18日(2010.3.18)
審査請求日　平成24年8月7日(2012.8.7)
(31)優先権主張番号　0816880.9
(32)優先日　平成20年9月15日(2008.9.15)
(33)優先権主張国　英国(GB)

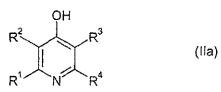
前置審査

(73)特許権者　500371307
シンジェンタ　リミテッド
イギリス国　サリー　ジーユー２　７ワイエイチ，ギルドフォード，サリー　リサーチ　パーク，プリーストリー　ロード，ユアロピーアン　リージョナル　センター
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

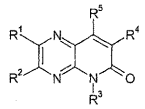
最終頁に続く

(54)【発明の名称】除草剤耐性植物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
作物及び雑草が生育する圃場（ｌｏｃｕｓ）で選択的に雑草を防除する方法であって、雑草を防除する量の、
式（ＩＩａ）
【化１】


(IIa)

［式中、
R^1、R^2、R^3 及びR^4 は、独立して水素又はハロゲンであり；但しR^1、R^2、R^3 及びR^4 の３つ以上がハロゲンである］
の化合物又はその塩；
式（ＩＩｂ）
【化２】


(IIb)

［式中、
R^1 及びR^2 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、水素、C_1－C_{10} アルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} シアノアルキル－、C_1－C_{10} アルコキシカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、Ｎ－Ｃ

3

$_1$－C$_3$ アルキル－アミノカルボニル－C$_1$ －C$_6$ アルキル－、N，N－ジ－（C$_1$ －C$_3$ アルキル）－アミノカルボニルC$_1$ －C$_6$ アルキル－、アリール－C$_1$ －C$_6$ アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたアリール－C$_1$ －C$_6$ アルキル－、又はヘテロシクリル－C$_1$ －C$_6$ アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたヘテロシクリル－C$_1$ －C$_6$ アルキル－であり；

R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一又は相違するR^8 で置換されたヘテロアリールであり；

R^5 は、ヒドロキシ、R^9 －オキシ－、R^{10} －カルボニルオキシ－、トリ－R^{11} －シリルオキシ－又はR^{12} －スルホニルオキシ－であり、

各R^6 、R^7 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキル、C$_2$ －C$_{10}$ アルケニル、C$_2$ －C$_{10}$ アルキニル、ヒドロキシ、C$_1$ －C$_{10}$ アルコキシ、C$_1$ －C$_4$ ハロアルコキシ、C$_1$ －C$_{10}$ アルコキシ－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、C$_3$ －C$_7$ シクロアルキル、C$_3$ －C$_7$ シクロアルコキシ、C$_3$ －C$_7$ シクロアルキル－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、C$_3$ －C$_7$ シクロアルキル－C$_1$ －C$_4$ アルコキシ－、C$_1$ －C$_6$ アルキルカルボニル－、フォルミル、C$_1$ －C$_4$ アルコキシ－カルボニル－、C$_1$ －C$_4$ アルキルカルボニルオキシ－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルチオ－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキルチオ－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルスルフィニル－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキルスルフィニル－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルスルホニル－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルアミノ－、ジ－C$_1$ －C$_{10}$ アルキルアミノ－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール、アリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、ヘテロアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；

R^9 は、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、C$_2$ －C$_{10}$ アルケニル、C$_2$ －C$_{10}$ アルキニル、又はアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－若しくはアリール部分が１～５個のハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_6$ アルキル、C$_1$ －C$_6$ ハロアルキル又はC$_1$ －C$_6$ アルコキシから独立して選択される置換基で置換されたアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－であり；

R^{10} は、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、C$_3$ －C$_{10}$ シクロアルキル、C$_3$ －C$_{10}$ シクロアルキル－C$_1$ －C$_{10}$ アルキル－、C$_1$ －C$_{10}$ ハロアルキル、C$_2$ －C$_{10}$ アルケニル、C$_2$ －C$_{10}$ アルキニル、C$_1$ －C$_4$ アルコキシ－C$_1$ －C$_{10}$ アルキル－、C$_1$ －C$_4$ アルキルチオ－C$_1$ －C$_4$ アルキル、C$_1$ －C$_{10}$ アルコキシ、C$_2$ －C$_{10}$ アルケニルオキシ、C$_2$ －C$_{10}$ アルキニルオキシ、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルチオ－、N－C$_1$ －C$_4$ アルキル－アミノ－、N，N－ジ－（C$_1$ －C$_4$ アルキル）－アミノ－、アリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたアリール、アリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、ヘテロアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたヘテロアリール－C$_1$ －C$_4$ アルキル－、アリールオキシ若しくは１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたアリールオキシ、ヘテロアリールオキシ若しくは１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたヘテロアリールオキシ、アリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{14} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；

各R^{11} は、独立して、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、又はフェニル、若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_6$ アルキル、C$_1$ －C$_6$ ハロアルキル若しくはC$_1$ －C$_6$ アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたフェニルであり；

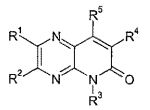
R^{12} は、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、又はフェニル、若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_6$ アルキル、C$_1$ －C$_6$ ハロアルキル若しくはC$_1$ －C$_6$ アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたフェニルであり；

各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_6$ アルキル、C$_1$ －C$_6$ ハロアルキル若しくはC$_1$ －C$_6$ アルコキシであり；そして

各R^{14} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C$_1$ －C$_{10}$ アルキル、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキル、C$_1$ －C$_{10}$ アルコキシ、C$_1$ －C$_4$ アルコキシカルボニル－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルコキシ、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルチオ－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキルチオ－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルスルフィニル－、C$_1$ －C$_4$ ハロアルキルスルフィニル－、C$_1$ －C$_{10}$ アルキルスルホニル－、C$_1$ －C$_4$ ハ

5

ロアルキルスルホニル－、アリール若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～４個の置換基で置換されたヘテロアリールである］
の化合物、又はその塩若しくはＮ－オキシド；
式（ＩＩｃ）
【化３】

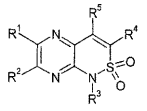


(IIc)

［式中、
R^1 及びR^2 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_4 ハロアルケニル又はC_2－C_4 ハロアルキニルであり；
R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一又は相違するR^8 で置換されたヘテロアリールであり；
R^5 は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R^6 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1－C_{10} アルコキシ、C_1－C_4 ハロアルコキシ、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル、C_3－C_7 シクロアルコキシ、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルコキシ－、C_1－C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1－C_4 アルコキシカルボニル－、C_1－C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1－C_{10} アルキルチオ－、C_1－C_4 ハロアルキルチオ－、C_1－C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1－C_{10} アルキルスルホニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1－C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1－C_{10} アルキルアミノ－、C_1－C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール

6

、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール－C_1－C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして
各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシである］
の化合物、又はその塩若しくはＮ－オキシド；
式（ＩＩｄ）
【化４】

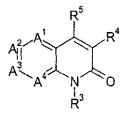


(IId)

［式中、
R^1 及びR^2 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、水素、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_4 ハロアルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_2－C_4 ハロアルキニル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} シアノアルキル－、C_1－C_{10} アルコキシカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、Ｎ－C_1－C_3 アルキル－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、Ｎ，Ｎ－ジ－（C_1－C_3 アルキル）－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、アリール－C_1－C_6 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたアリール－C_1－C_6 アルキル－、又はヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－であり；

7

R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一又は相違するR^8 で置換されたヘテロアリールであり；
R^5 は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R^6 、R^7 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1 －C_{10} アルキル、C_1 －C_4 ハロアルキル、C_2 －C_{10} アルケニル、C_2 －C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1 －C_{10} アルコキシ、C_1 －C_4 ハロアルコキシ、C_1 －C_{10} アルコキシ－C_1 －C_4 アルキル－、C_3 －C_7 シクロアルキル、C_3 －C_7 シクロアルコキシ、C_3 －C_7 シクロアルキル－C_1 －C_4 アルキル－、C_3 －C_7 シクロアルキル－C_1 －C_4 アルコキシ－、C_1 －C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1 －C_4 アルコキシカルボニル－、C_1 －C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1 －C_{10} アルキルチオ－、C_1 －C_4 ハロアルキルチオ－、C_1 －C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1 －C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1 －C_{10} アルキルスルホニル－、C_1 －C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1 －C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1 －C_{10} アルキルアミノ－、C_1 －C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1 －C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリール－C_1 －C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1 －C_4 アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリール－C_1 －C_4 アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして
各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1 －C_6 アルキル、C_1 －C_6 ハロアルキル若しくはC_1 －C_6 アルコキシである］
の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；
式（ＩＩｅ）
【化５】


(IIe)

8

［式中、
A^1 、A^2 、A^3 及びA^4 は、独立して、C－R^1 又はNであり、但しA^1 、A^2 、A^3 及びA^4 の１つ以上がNであり、及び但し、A^1 及びA^4 の両方がNの場合、A^2 及びA^3 は両方がC－R^1 ではなく；
各R^1 は、独立して水素、C_1 －C_4 アルキル、C_1 －C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1 －C_4 アルコキシ、C_1 －C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、水素、C_1 －C_{10} アルキル、C_1 －C_4 ハロアルキル、C_2 －C_{10} アルケニル、C_2 －C_4 ハロアルケニル、C_2 －C_{10} アルキニル、C_2 －C_4 ハロアルキニル、C_3 －C_{10} シクロアルキル、C_3 －C_{10} シクロアルキル－C_1 －C_6 アルキル－、C_1 －C_{10} アルコキシ－C_1 －C_6 アルキル－、C_1 －C_{10} シアノアルキル－、C_1 －C_{10} アルコキシカルボニル－C_1 －C_6 アルキル－、N－C_1 －C_3 アルキル－アミノカルボニル－C_1 －C_6 アルキル－、N，N－ジ－（C_1 －C_3 アルキル）－アミノカルボニル－C_1 －C_6 アルキル－、アリール－C_1 －C_6 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたアリール－C_1 －C_6 アルキル－、又はヘテロシクリル－C_1 －C_6 アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一又は相違するR^7 で置換されたヘテロシクリル－C_1 －C_6 アルキル－であり；
R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一又は相違するR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一又は相違するR^8 で置換されたヘテロアリールであり；
R^5 は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R^6 、R^7 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1 －C_{10} アルキル、C_1 －C_4 ハロアルキル、C_2 －C_{10} アルケニル、C_2 －C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1 －C_{10} アルコキシ、C_1 －C_4 ハロアルコキシ、C_1 －C_{10} アルコキシ－C_1 －C_4 アルキル－、C_3 －C_7 シクロアルキル、C_3 －C_7 シクロアルコキシ、C_3 －C_7 シクロアルキル－C_1 －C_4 アルキル－、C_3 －C_7 シクロアルキル－C_1 －C_4 アルコキシ－、C_1 －C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1 －C_4 アルコキシカルボニル－、C_1 －C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1 －C_{10} アルキルチオ－、C_1 －C_4 ハロアルキルチオ－、C_1 －C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1 －C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1 －C_{10} アルキルスルホニル－、C_1 －C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1 －C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1 －C_{10} アルキルアミノ－、C_1 －C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若し

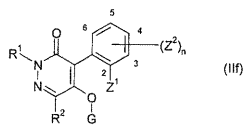
9

くは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1－C_4アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたアリール－C_1－C_4アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一又は相違するR^{13}で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして

各R^{13}は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6アルキル、C_1－C_6ハロアルキル若しくはC_1－C_6アルコキシである］

の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；並びに式（ＩＩｆ）

【化６】



(IIf)

［式中、

R^1は、C_1－C_6アルキル又はC_1－C_6アルキルオキシ－C_1－C_6アルキルであり；

R^2は水素又はC_1－C_6アルキルであり；

Gは、水素、－（C＝L）R^3、－（SO_2）R^4、又は－（P＝L）R^5 R^6であり、ここでLが酸素又は硫黄であり；

R^3は、水素、C_1－C_6アルキル、C_3－C_8シクロアルキル、C_2－C_6アルケニル、C_2－C_6アルキニル、C_6－C_{10}アリール、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_6アルキル、C_1－C_6アルキルオキシ、C_3－C_8シクロアルキルオキシ、C_2－C_6アルケニルオキシ、C_2－C_6アルキニルオキシ、C_6－C_{10}アリールオキシ、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_6アルキルオキシ－、アミノ、C_1－C_6アルキルアミノ、C_2－C_6アルケニルアミノ、C_6－C_{10}アリールアミノ、ジ（C_1－C_6アルキル）アミノ、ジ（C_2－C_6アルケニル）アミノ、（C_1－C_6アルキル）（C_6－C_{10}アリール）アミノ、又は３～８員の窒素含有ヘテロ環式環であり、

R^4は、C_1－C_6アルキル、C_6－C_{10}アリール、C_1－C_6アリールアミノ基、又はジ（C_1－C_6アルキル）アミノであり；そして

10

R^5及びR^6は、同一又は相違し、そして独立してC_1－C_6アルキル、C_3－C_8シクロアルキル、C_2－C_6アルケニル、C_6－C_{10}アリール、C_1－C_6アルキルオキシ、C_3－C_8シクロアルキルオキシ、C_6－C_{10}アリールオキシ、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_6アルキルオキシ、C_1－C_6アルキルチオ、C_1－C_6アルキルアミノ又はジ（C_1－C_6アルキル）アミノであり、

ここでR^3、R^4、R^5及びR^6の基の一つ以上が、ハロゲン、C_3－C_8シクロアルキル、C_6－C_{10}アリール、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_6アルキル－、C_3－C_8シクロアルキルオキシ、C_6－C_{10}アリールオキシ、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_6アルキルオキシ、C_6－C_{10}アリールアミノ、（C_1－C_6アルキル）（C_6－C_{10}アリール）アミノ、及び１つ以上のC_1－C_6アルキルで置換された、又は置換されない３～８員の窒素含有ヘテロ環式環で置換され、又は置換されず；

Z^1はC_1－C_6アルキルであり；

Z^2はC_1－C_6アルキルであり；

ｎは０、１、２、３又は４であり；

そしてｎが２以上の整数を表すとき各Z^2は、同一又は相違し、そして、Z^1及びZ^2の基の中の炭素原子の数の合計が、２以上である］

の化合物；

からなる群から選択されるホモゲンチセートソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）阻害除草剤及び／又は、メソトリオン、スルコトリオン、イソキサフルトール、テンボトリオン、トプラメゾン、ベンゾフェナップ、ピラゾレート、ピラゾキシフェン、ピラスルフォトール、ケトスピラドックス若しくはその遊離酸、４－ヒドロキシ－３－［［２－（２－メトキシエトキシ）メチル］－６－（トリフルオロメチル）－３－ピリジニル］カルボニル］－ビシクロ［３．２．１］オクト－３－エン－２－オン、［２－クロロ－３－（２－メトキシエトキシ）－４－（メチルスルホニル）フェニル］（１－エチル－５－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノン、α－（シクロプロピルカルボニル）－２－（メチルスルホニル）－β－オキソ－４－（トリフルオロメチル）－ベンゼンプロパンニトリル、（２，３－ジヒドロ－３，３，４－トリメチル１，１－ジオキシドベンゾ［ｂ］チエン－５－イル）（５－ヒドロキシ－１－メチル－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノンからなる群から選択されるヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）阻害除草剤を含有する農薬組成物を前記圃場に施用することを含み、前記作物が、ＨＳＴをコードする領域を含む１つ以上の組換えポリヌクレオチドを保有する、前記方法。

【請求項２】

11

前記作物が、ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）をコードする領域を含む追加の組換えポリヌクレオチドを保有する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

作物及び雑草が生育する圃場で選択的に雑草を防除する方法であって、雑草を防除する量の、請求項１に記載されたホモゲンチセートソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）阻害除草剤を含有する農薬組成物を前記圃場に施用することを含み、前記作物が、ＨＰＰＤ酵素をコードする領域を含む１つ以上の組換えポリヌクレオチドを保有する、前記方法。

【請求項４】

前記農薬組成物が、請求項１に記載されたＨＳＴ阻害除草剤及び請求項１に記載されたヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）阻害除草剤を含有する、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

前記ＨＳＴ酵素が、アラビドプシス・サリアナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）、グリシン・マックス（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｍａｘ）、オリザ・サティバ（Ｏｒｙｚａ　ｓａｔｉｖａ）又はクラミドモナス・レインハルドティイ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）に由来する、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

前記ＨＳＴ酵素が、

（ａ）配列番号１～１０として記載されるＨＳＴ酵素；及び

（ｂ）以下のポリペプチドモチーフ：

Ｗ－（Ｒ／Ｋ）－Ｆ－Ｌ－Ｒ－Ｐ－Ｈ－Ｔ－Ｉ－Ｒ－Ｇ－Ｔ；及び／又は

Ｎ－Ｇ－（Ｙ／Ｆ）－Ｉ－Ｖ－Ｇ－Ｉ－Ｎ－Ｑ－Ｉ－（Ｙ／Ｆ）－Ｄ；及び／又は

Ｉ－Ａ－Ｉ－Ｔ－Ｋ－Ｄ－Ｌ－Ｐ；及び／又は

Ｙ－（Ｒ／Ｑ）－（Ｆ／Ｗ）－（Ｉ／Ｖ）－Ｗ－Ｎ－Ｌ－Ｆ－Ｙ

の１つ以上を保有するＨＳＴ

からなる群から選択される、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

前記作物が、更なる除草剤耐性酵素をコードする更なる組換えポリペプチドを保有する、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記更なる除草剤耐性酵素が、５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸合成酵素（ＥＰＳＰＳ）、グリホセートアセチルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）、シトクロームＰ４５０、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＴ）、アセト乳酸合成酵素（ＡＬＳ）、

12

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（ＰＰＧＯ）、フィトエンデサチュラーゼ（ＰＤ）、ジカンバ分解酵素及びアリールオキシ除草剤分解酵素からなる群から選択される、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記農薬組成物が、１つ以上の追加の除草剤を含有する、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

前記１つ以上の追加の除草剤が、グリホセート（その農薬として許容される塩を含む）；グルフォシネート（その農薬として許容される塩を含む）；クロロアセトアニリド；光化学系ＩＩ阻害剤；ＡＬＳ阻害剤；及びジフェニルエーテル；からなる群から選択される、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記１つ以上の追加の除草剤が、グリホセート及び／又はＰＳ－ＩＩ阻害除草剤である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

更に殺昆虫剤及び／又は殺真菌剤を前記圃場に施用することを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、圃場（ｌｏｃｕｓ）の雑草を選択的に防除する方法に関する。更に、本発明は、組換えＤＮＡ技術に関し、特に遺伝子組換えしていない同種植物と比較して除草剤に対する実質的な抵抗性又は実質的な耐性を呈する遺伝子組換え植物の生産に関する。遺伝子組換え植物において取得される、除草剤の用量／応答性の曲線が、非耐性の同種植物において取得されるものと比較して右にシフトする場合、当該遺伝子組換え植物は、実質的に「耐性」である。そのような用量／応答性の曲線は、ｘ軸に「用量」を表示し、ｙ軸に「死滅パーセンテージ」、「除草効果」等を表示する。耐性植物は、典型的には、所定の除草効果を生じさせるために、非耐性の同種植物の２倍以上の除草剤を要する。除草剤に対して実質的に「抵抗性」の植物は、野外において雑草を死滅させるのに農場で典型的に採用される濃度及び施用率で除草剤が与えられたとき、壊死性、溶解性、萎黄性（ｃｈｌｏｒｏｔｉｃ）、又は他の病変を生じさせず、生じさせたとしてもそれらがわずかなものを指す。

【０００２】

より具体的には、本発明は、プラストキノンに至る経路のヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）及び／又はこれに続くホモゲンチセートソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）のステップを阻害する除草剤に抵抗性の植物の生産に関する。

【背景技術】

13

【０００３】
ＨＰＰＤの阻害により作用する除草剤は、当該技術分野で公知である。ＨＰＰＤの阻害は、チロシンからのプラストキノン（ＰＱ）の生合成をブロックする。ＰＱは、光合成中心の光保護に必須のカロテノイド色素の生合成における必須の補因子である。ＨＰＰＤ阻害除草剤は、師部移動脱色剤（ｐｈｌｏｅｍ－ｍｏｂｉｌｅ　ｂｌｅａｃｈｅｒ）であり、光に晒された新しい分裂組織及び葉を白化させる。白化部分はカロテノイドを欠き、クロロフィルが光破壊（ｐｈｏｔｏ－ｄｅｓｔｒｕｃｔｉｏｎ）されており、それ自体、一重項酸素の光生産（ｐｈｏｔｏ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）を通じての光破壊の因子となる。ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する実質的な抵抗性、又は実質的な耐性を呈する遺伝子組換え植物の生産方法は、例えばＷＯ０２／４６３８７等で、既に報告されている。

【０００４】
プラスキノン生合成経路においてＨＰＰＤ以下の工程を触媒する酵素は、ＨＳＴである。ＨＳＴ酵素は、ホモゲンチセートからカルボキシル基を除去し、かつそれにソラネシルジホスフェートからソラネシル基を転移して、プラストキノンに至る前記生合成経路の中間体である２－メチル－６－ソラネシル－１，４－ベンゾキノリル（ＭＳＢＱ）を形成する、フェニルトランスフェラーゼである。ＨＳＴ酵素は、細胞膜結合性であり、それらをコードする遺伝子は、プラスチド標的配列を有する。ＨＳＴをアッセイする方法は、近年開示された。

【０００５】
遺伝子組換え植物中でのＨＳＴの過剰発現が報告されており、そして当該植物のα－トコフェロールの濃度は僅かに高いことが示されている。しかしながら、ＨＳＴが、ＨＳＴを阻害することにより全体的に又は部分的に作用する、所定のクラスの除草化合物の標的部位であることは、これまで認識されていなかった。そして今日、とりわけ、遺伝子組換え植物中でのＨＳＴの過剰発現により、ＨＳＴ阻害除草剤及び／又はＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性がもたらされることが見出された。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００６】
よって、本発明において、作物及び雑草が生育する圃場の雑草を選択的に防除する方法が提供され、当該方法は、雑草を防除する量の、ホモゲンチセートソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）阻害除草剤及び／又はヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）阻害除草剤を含有する農薬組成物を前記圃場に施用することを含み、当該作物は、ＨＳＴをコードする領域を含む１つ以上のヘテロ接合組換えポリヌクレオチドを保有する。前記方法の好ましい態様において、前記作物は、更に、ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）をコードする領域を含む追加のヘテロ接合ポリヌクレオチドを保有する。

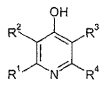
14

【０００７】
なおも更に、本発明は、作物及び雑草が生育する圃場の雑草を選択的に防除する方法を提供し、当該方法は、雑草を防除する量の、ホモゲンチセートソラネシルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）阻害除草剤を含有する農薬組成物を前記圃場に施用することを含み、当該作物は、ＨＰＰＤをコードする領域を含む１つ以上のヘテロ接合組換えポリヌクレオチドを保有する。

【０００８】
好ましい態様において、上記方法において言及される除草組成物は、ＨＳＴ阻害除草剤及びＨＰＰＤ阻害除草剤の両方を含有する。

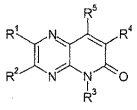
【０００９】
本発明の目的において、ＨＳＴ阻害除草剤は、本明細書中で設定される「全抽出」アッセイ方法を使用して、１５０ｐｐｍ未満、好ましくは６０ｐｐｍ未満のＩＣ５０でアラビドプシスＨＳＴを阻害する分子自体、又はこれを生じるプロサイド（ｐｒｏｃｉｄｅ）である。ＨＳＴ阻害除草剤は、ＨＰＰＤ阻害剤としても作用する場合があり（ＨＰＰＤ酵素アッセイ及び／又はＨＰＰＤ若しくはＨＳＴ過剰発現遺伝子組換え植物株の応答の差異を使用して同定可能である）、そしてそれ故に、下記のように、それらのＨＳＴの阻害の効果を自己相乗化することに注目すべきである。

【００１０】
好ましくは、ＨＳＴ阻害除草剤は、
式（ＩＩａ）
【化１】


(IIa)

［式中、
R^1、R^2、R^3及びR^4は、独立して水素又はハロゲンであり；但しR^1、R^2、R^3及びR^4の３つ以上がハロゲンである］
の化合物又はその塩；

【００１１】
式（ＩＩｂ）
【化２】


(IIb)

［式中、
R^1及びR^2は、独立して水素、C_1－C_4アルキル、

15

C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6で置換されたヘテロアリールであり；

R^3は、水素、C_1－C_{10} アルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} シアノアルキル－、C_1－C_{10} アルコキシカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N－C_1－C_3 アルキル－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N，N－ジ－（C_1－C_3 アルキル）－アミノカルボニルC_1－C_6 アルキル－、アリール－C_1－C_6 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7で置換されたアリール－C_1－C_6 アルキル－、又はヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7で置換されたヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－であり；

R^4は、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^8で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一でも相異してもよいR^8で置換されたヘテロアリールであり；

R^5は、ヒドロキシ、R^9－オキシ－、R^{10}－カルボニルオキシ－、トリ－R^{11}－シリルオキシ－又はR^{12}－スルホニルオキシ－であり、

各R^6、R^7及びR^8は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1－C_{10} アルコキシ、C_1－C_4 ハロアルコキシ、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル、C_3－C_7 シクロアルコキシ、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルコキシ－、C_1－C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1－C_4 アルコキシ－カルボニル－、C_1－C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1－C_{10} アルキルチオ－、C_1－C_4 ハロアルキルチオ－、C_1－C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1－C_{10} アルキルスルホニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1－C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1－C_{10} アルキルアミノ－、C_1－C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換

16

されたアリール－C_1－C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13}で置換されたヘテロアリールチオ－であり；

R^9は、C_1－C_{10} アルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、又はアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～５個のハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル又はC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される置換基で置換されたアリール－C_1－C_4 アルキル－であり；

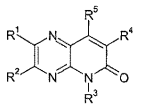
R^{10}は、C_1－C_{10} アルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_{10} アルキル－、C_1－C_{10} ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_1－C_4 アルコキシ－C_1－C_{10} アルキル－、C_1－C_4 アルキルチオ－C_1－C_4 アルキル、C_1－C_{10} アルコキシ、C_2－C_{10} アルケニルオキシ、C_2－C_{10} アルキニルオキシ、C_1－C_{10} アルキルチオ－、N－C_1－C_4 アルキル－アミノ－、N，N－ジ－（C_1－C_4 アルキル）－アミノ－、アリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたアリール、アリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたアリール－C_1－C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－、アリールオキシ若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたアリールオキシ、ヘテロアリールオキシ若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたヘテロアリールオキシ、アリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{14}で置換されたヘテロアリールチオ－であり；

各R^{11}は、独立して、C_1－C_{10} アルキル、又はフェニル、若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたフェニルであり；

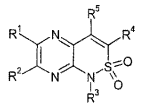
R^{12}は、C_1－C_{10} アルキル、又はフェニル、若し

17

くはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたフェニルであり；
各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシであり；そして
各R^{14} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_1－C_{10} アルコキシ、C_1－C_4 アルコキシカルボニル－、C_1－C_4 ハロアルコキシ、C_1－C_{10} アルキルチオ－、C_1－C_4 ハロアルキルチオ－、C_1－C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1－C_{10} アルキルスルホニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルホニル－、アリール若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくはハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシから独立して選択される１～４個の置換基で置換されたヘテロアリールである］
の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；
【００１２】
式（ＩＩｃ）
【化３】


(IIc)

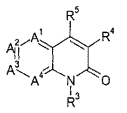
［式中、
R^1 及びR^2 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_4 ハロアルケニル又はC_2－C_4 ハロアルキニルであり；
R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一でも相異してもよいR^8 で置換されたヘテロアリールであり；
R^5 は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R^6 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1－C_{10} アルコキシ、C_1－C_4 ハロアルコキシ、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル、C_3－C_7 シクロアルコキシ、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルコキシ－、C_1－C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1－C_4 アルコキシカルボニル－、C_1－C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1－C_{10} アルキルチオ－、C_1－C_4 ハロアルキルチオ－、C_1－C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1－C_{10} アルキルスルホニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1－C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1－C_{10} アルキルアミノ－、C_1－C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリール－C_1－C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして
各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシである］
の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；
【００１３】
式（ＩＩｄ）
【化４】


(IId)

［式中、
R^1 及びR^2 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたヘテロ

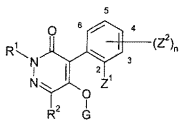
アリールであり；
R^3 は、水素、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_4 ハロアルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_2－C_4 ハロアルキニル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} シアノアルキル－、C_1－C_{10} アルコキシカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N－C_1－C_3 アルキル－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N，N－ジ－（C_1－C_3 アルキル）－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、アリール－C_1－C_6 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7 で置換されたアリール－C_1－C_6 アルキル－、又はヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7 で置換されたヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－であり；
R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^8 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一でも相異してもよいR^8 で置換されたヘテロアリールであり；
R^5 は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R^6 、R^7 及びR^8 は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、ヒドロキシ、C_1－C_{10} アルコキシ、C_1－C_4 ハロアルコキシ、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル、C_3－C_7 シクロアルコキシ、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルキル－、C_3－C_7 シクロアルキル－C_1－C_4 アルコキシ－、C_1－C_6 アルキルカルボニル－、フォルミル、C_1－C_4 アルコキシカルボニル－、C_1－C_4 アルキルカルボニルオキシ－、C_1－C_{10} アルキルチオ－、C_1－C_4 ハロアルキルチオ－、C_1－C_{10} アルキルスルフィニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルフィニル－、C_1－C_{10} アルキルスルホニル－、C_1－C_4 ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C_1－C_{10} アルキルアミノ－、ジ－C_1－C_{10} アルキルアミノ－、C_1－C_{10} アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリール、アリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリール－C_1－C_4 アルキル－、ヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリール－C_1－C_4 アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR^{13} で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして
各R^{13} は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C_1－C_6 アルキル、C_1－C_6 ハロアルキル若しくはC_1－C_6 アルコキシである］
の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；

【００１４】
式（ＩＩｅ）
【化５】


(IIe)

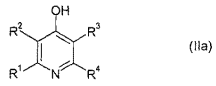
［式中、
A^1 、A^2 、A^3 及びA^4 は、独立して、C－R^1 又はNであり、但しA^1 、A^2 、A^3 及びA^4 の１つ以上がNであり、及び但し、A^1 及びA^4 の両方がNの場合、A^2 及びA^3 は両方がC－R^1 ではなく；
各R^1 は、独立して水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、C_1－C_4 アルコキシ、C_1－C_4 アルキルチオ、アリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～５個の同一でも相異してもよいR^6 で置換されたヘテロアリールであり；
R^3 は、水素、C_1－C_{10} アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、C_2－C_{10} アルケニル、C_2－C_4 ハロアルケニル、C_2－C_{10} アルキニル、C_2－C_4 ハロアルキニル、C_3－C_{10} シクロアルキル、C_3－C_{10} シクロアルキル－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} アルコキシ－C_1－C_6 アルキル－、C_1－C_{10} シアノアルキル－、C_1－C_{10} アルコキシカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N－C_1－C_3 アルキル－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、N，N－ジ－（C_1－C_3 アルキル）－アミノカルボニル－C_1－C_6 アルキル－、アリール－C_1－C_6 アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7 で置換されたアリール－C_1－C_6 アルキル－、又はヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－若しくはヘテロシクリル部分が１～３個の同一でも相異してもよいR^7 で置換されたヘテロシクリル－C_1－C_6 アルキル－であり；
R^4 は、アリール若しくは１～５個の同一でも相異して

もよいR[8]で置換されたアリール、又はヘテロアリール若しくは１～４個の同一でも相異してもよいR[8]で置換されたヘテロアリールであり；
R[5]は、ヒドロキシ、又はヒドロキシ基に代謝され得る基であり、
各R[6]、R[7]及びR[8]は独立して、ハロ、シアノ、ニトロ、C[1]－C[10]アルキル、C[1]－C[4]ハロアルキル、C[2]－C[10]アルケニル、C[2]－C[10]アルキニル、ヒドロキシ、C[1]－C[10]アルコキシ、C[1]－C[4]ハロアルコキシ、C[1]－C[10]アルコキシ－C[1]－C[4]アルキル－、C[3]－C[7]シクロアルキル、C[3]－C[7]シクロアルコキシ、C[3]－C[7]シクロアルキル－C[1]－C[4]アルキル－、C[3]－C[7]シクロアルキル－C[1]－C[4]アルコキシ－、C[1]－C[6]アルキルカルボニル－、フォルミル、C[1]－C[4]アルコキシカルボニル－、C[1]－C[4]アルキルカルボニルオキシ－、C[1]－C[10]アルキルチオ－、C[1]－C[4]ハロアルキルチオ－、C[1]－C[10]アルキルスルフィニル－、C[1]－C[4]ハロアルキルスルフィニル－、C[1]－C[10]アルキルスルホニル－、C[1]－C[4]ハロアルキルスルホニル－、アミノ、C[1]－C[10]アルキルアミノ－、ジ－C[1]－C[10]アルキルアミノ－、C[1]－C[10]アルキルカルボニルアミノ－、アリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたアリール、ヘテロアリール若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたヘテロアリール、アリール－C[1]－C[4]アルキル－若しくはアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたアリール－C[1]－C[4]アルキル－、ヘテロアリール－C[1]－C[4]アルキル－若しくはヘテロアリール部分が１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたヘテロアリール－C[1]－C[4]アルキル－、アリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたアリールオキシ－、ヘテロアリールオキシ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたヘテロアリールオキシ－、アリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたアリールチオ－、又はヘテロアリールチオ－若しくは１～３個の同一でも相異してもよいR[13]で置換されたヘテロアリールチオ－であり；そして
各R[13]は、独立してハロ、シアノ、ニトロ、C[1]－C[6]アルキル、C[1]－C[6]ハロアルキル若しくはC[1]－C[6]アルコキシである］
の化合物、又はその塩若しくはN－オキシド；並びに
【００１５】
式（ＩＩｆ）
【化６】

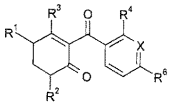

(IIf)

［式中、
R[1]は、C[1]－C[6]アルキル又はC[1]－C[6]アルキルオキシ－C[1]－C[6]アルキルであり；
R[2]は水素又はC[1]－C[6]アルキルであり；
Gは、水素、－（C＝L）R[3]、－（SO[2]）R[4]、又は－（P＝L）R[5] R[6]であり、ここでLが酸素又は硫黄であり；
R[3]は、水素、C[1]－C[6]アルキル、C[3]－C[8]シクロアルキル、C[2]－C[6]アルケニル、C[2]－C[6]アルキニル、C[6]－C[10]アリール、C[6]－C[10]アリール－C[1]－C[6]アルキル、C[1]－C[6]アルキルオキシ、C[3]－C[8]シクロアルキルオキシ、C[2]－C[6]アルケニルオキシ、C[2]－C[6]アルキニルオキシ、C[6]－C[10]アリールオキシ、C[6]－C[10]アリール－C[1]－C[6]アルキルオキシ－、アミノ、C[1]－C[6]アルキルアミノ、C[2]－C[6]アルケニルアミノ、C[6]－C[10]アリールアミノ、ジ（C[1]－C[6]アルキル）アミノ、ジ（C[2]－C[6]アルケニル）アミノ、（C[1]－C[6]アルキル）（C[6]－C[10]アリール）アミノ、又は３～８員の窒素含有ヘテロ環式環であり、
R[4]は、C[1]－C[6]アルキル、C[6]－C[10]アリール、C[1]－C[6]アリールアミノ基、又はジ（C[1]－C[6]アルキル）アミノであり；そして
R[5]及びR[6]は、同一でも相異してもよく、そして独立してC[1]－C[6]アルキル、C[3]－C[8]シクロアルキル、C[2]－C[6]アルケニル、C[6]－C[10]アリール、C[1]－C[6]アルキルオキシ、C[3]－C[8]シクロアルキルオキシ、C[6]－C[10]アリールオキシ、C[6]－C[10]アリール－C[1]－C[6]アルキルオキシ、C[1]－C[6]アルキルチオ、C[1]－C[6]アルキルアミノ又はジ（C[1]－C[6]アルキル）アミノであり、
ここでR[3]、R[4]、R[5]及びR[6]の基の任意のものが、ハロゲン、C[3]－C[8]シクロアルキル、C[6]－C[10]アリール、C[6]－C[10]アリール－C[1]－C[6]アルキル－、C[3]－C[8]シクロアルキルオキシ、C[6]－C[10]アリールオキシ、C[6]－C[10]アリール－C[1]－C[6]アルキルオキシ、C[6]－C[10]アリールアミノ、（C[1]－C[6]アルキル）（C[6]－C[10]アリール）アミノ、及び１つ以上のC[1]－C[6]アルキルで置換されていてもよい３～８員の窒素含有ヘテロ環式環で置換されてもよく；
Z[1]はC[1]－C[6]アルキルであり；
Z[2]はC[1]－C[6]アルキルであり；
ｎは０、１、２、３又は４であり；
そしてｎが２以上の整数を表すとき各Z[2]は、同一でも

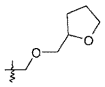
相異してもよく、そして、Z^1 及びZ^2 の基の中の炭素原子の数の合計が、２以上である］
の化合物；
からなる群から選択される。
【００１６】
式（ＩＩａ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばハロキシジン及びピリクロール等が挙げられる。式（ＩＩｂ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばWO２００８／００９９０８に記載されている。式（ＩＩｃ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばWO２００８／０７１９１８に記載されている。式（ＩＩｄ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばWO２００９／０６３１８０に記載されている。式（ＩＩｅ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばWO２００９／０９０４０１及びWO２００９／０９０４０２に記載されている。式（ＩＩｆ）のＨＳＴ化合物は公知であり、例えばWO２００７／１１９４３４に記載されている。
【００１７】
好ましくは、式（ＩＩａ）
【化７】



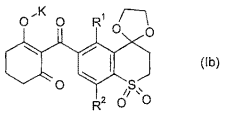
の化合物において、R^1 、R^2 、R^3 及びR^4 は、独立して、水素、ブロモ、クロロ又はフルオロであり；但しR^1 、R^2 、R^3 及びR^4 の１つ以上がブロモ、クロロ又はフルオロのいずれかであり、最も好ましくは、当該式（ＩＩａ）の化合物において、R^1 及びR^4 はフルオロ、そしてR^2 及びR^3 はクロロであり（ハロキシジン）、又はR^1 、R^2 及びR^3 はクロロ、そしてR^4 は水素である（ピリクロール）。
【００１８】
「ＨＰＰＤ阻害除草剤」という用語は、直接、又はプロサイドとして、ＨＰＰＤを阻害するように作用し、活性形態において、WO０２／４６３８７に記載のオンレート及びオフレート手法を使用してアッセイしたとき、アラビドプシスＨＰＰＤに対して、Ｋｉ値が５ｎＭ未満、好ましくは１ｎＭ未満の除草剤を指す。本発明の範囲内において、ヒドロキシフェニルピルベート（又はピルビン酸）ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）、４－ジドロキシフェニルピルベート（又はピルビン酸）ジオキシゲナーゼ（４－ＨＰＰＤ）、及びｐ－ヒドロキシフェニルピルベート（又はピルビン酸）ジオキシゲナーゼ（ｐ－ＨＰＰＤ）は、同義語である。
【００１９】
好ましくは、前記ＨＰＰＤ阻害除草剤は、
式（Ｉａ）
【化８】



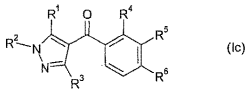
［式中、
R^1 及びR^2 は、水素であり、又は一緒になってエチレン橋を形成し；
R^3 は、ヒドロキシ又はフェニルチオ－であり；R^4 は、ハロゲン、ニトロ、C_1 －C_4 アルキル、C_1 －C_4 アルコキシ－C_1 －C_4 アルキル－、C_1 －C_4 アルコキシ－C_1 －C_4 アルコキシ－C_1 －C_4 アルキル－であり；
Ｘは、メチン、炭素又はC－R^5 であり、ここでR^5 は、水素、C_1 －C_4 ハロアルコキシC_1 －C_4 アルキル、又は以下の基
【化９】



であり；そして
R^6 は、アルキルスルホニル－又はハロアルキルである］
の化合物；
【００２０】
式（ＩＩｂ）
【化１０】



［式中、
R^1 及びR^2 は、独立してC_1 －C_4 アルキルである］
の化合物；及びその遊離酸；
【００２１】
式（Ｉｃ）
【化１１】

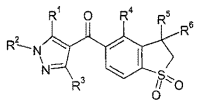


［式中、
R^1 はヒドロキシ、フェニルカルボニル－C_1 －C_4 アルコキシ－若しくはフェニル部分のパラ位がハロゲン又はC_1 －C_4 アルキルで置換されたフェニルカルボニル－C_1 －C_4 アルコキシ－、又はフェニルスルホニルオキシ－若しくはフェニル部分のパラ位がハロゲン又はC

25

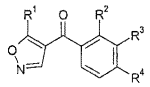
$_1$－C_4 アルキルで置換されたフェニルスルホニルオキシ－であり；
R^2 はC_1－C_4 アルキルであり；
R^3 は水素又はC_1－C_4 アルキルであり；
R^4 及びR^6 は、独立してハロゲン、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 ハロアルキル、又はC_1－C_4 アルキルスルホニル－であり；そして
R^5 は、水素、C_1－C_4 アルキル、C_1－C_4 アルコキシ－ C_1－C_4 アルコキシ－、又は
【化１２】

の基である］
の化合物；
【００２２】
式（Ｉｄ）
【化１３】



(Id)

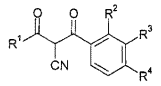
［式中、
R^1 はヒドロキシであり；
R^2 はC_1－C_4 アルキルであり；
R^3 は水素であり；そして
R^4、R^5 及びR^6 は、独立してC_1－C_4 アルキルである］
の化合物；
【００２３】
式（Ｉｅ）
【化１４】



(Ie)

［式中、
R^1 はシクロプロピルであり；
R^2 及びR^4 は独立してハロゲン、C_1－C_4 ハロアルキル、又はC_1－C_4 アルキルスルホニル－であり；そして
R^3 は水素である］
の化合物；並びに
【００２４】
式（Ｉｆ）
【化１５】

26



(If)

［式中、
R^1 はシクロプロピルであり；
R^2 及びR^4 は独立してハロゲン、C_1－C_4 ハロアルキル、又はC_1－C_4 アルキルスルホニル－であり；そして
R^3 は水素である］
の化合物；
からなる群から選択される。
【００２５】
ＨＰＰＤ阻害剤の例も、ＷＯ２００９／０１６８４１に記載されている。好ましい態様において、ＨＰＰＤ阻害剤は、ベンゾビシクロン、メソトリオン、スルコトリオン、テフリルトリオン、テンボトリオン、４－ヒドロキシ－３－［［２－（２－メトキシエトキシ）メチル］－６－（トリフルオロメチル）－３－ピリジニル］カルボニル］－ビシクロ［３．２．１］－オクト－３－エン－２－オン（ビシクロピロン）、ケトスピラドックス若しくはその遊離酸、ベンゾフェナップ、ピラスルフォトール、ピラゾリネート、ピラゾキシフェン、トプラメゾン、［２－クロロ－３－（２－メトキシエトキシ）－４－（メチルスルホニル）フェニル］（１－エチル－５－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノン、（２，３－ジヒドロ－３，３，４－トリメチル１，１－ジオキシドベンゾ［ｂ］チエン－５－イル）（５－ヒドロキシ－１－メチル－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノン、イソキサクロルトール（ｉｓｏｘａｃｈｌｏｒｔｏｌｅ）、イソキサフルトール、α－（シクロプロピルカルボニル）－２－（メチルスルホニル）－β－オキソ－４－クロロ－ベンゼンプロパンニトリル、及びα－（シクロプロピルカルボニル）－２－（メチルスルホニル）－β－オキソ－４－（トリフルオロメチル）－ベンゼンプロパンニトリルからなる群から選択される。
【００２６】
これらのＨＰＰＤ阻害剤は公知であり、以下のＣｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ登録番号を有する：ベンゾビシクロン（ＣＡＳ ＲＮ １５６９６３－６６－５）、メソトリオン（ＣＡＳ ＲＮ １０４２０６－８２－８）、スルコトリオン（ＣＡＳ ＲＮ ９９１０５－７７－８）、テフリルトリオン（ＣＡＳ ＲＮ ４７３２７８－７６－ １）、テンボトリオン（ＣＡＳ ＲＮ ３３５１０４－８４－２）、４－ヒドロキシ－３－［［２－（２－メトキシエトキシ）メチル］－６－（トリフルオロメチル）－３－ピリジニル］カルボニル］－ビシクロ［３．２．１］オクト－３－エン－２－オン（ＣＡＳ ＲＮ ３５２０１０－６８－５）、ケトスピラドックス（ＣＡＳ ＲＮ １９２７０８－９１－１）

27

若しくはその遊離酸（ＣＡＳ　ＲＮ　１８７２７０－８７－７）、ベンゾフェナップ（ＣＡＳ　ＲＮ８２６９２－４４－２）、ピラスルフォトール（ＣＡＳ　ＲＮ　３６５４００－　１１－９）、ピラゾリネート（ＣＡＳ　ＲＮ　５８０１１－６８－０）、ピラゾキシフェン（ＣＡＳ　ＲＮ　７１５６１－１１－０）、トプラメゾン（ＣＡＳ　ＲＮ　２１０６３１－６８－８）、［２－クロロ－３－（２－メトキシエトキシ）－４－（メチルスルホニル）フェニル］（１－エチル－５－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノン（ＣＡＳ　ＲＮ　１２８１３３－２７－７）、（２，３－ジヒドロ－３，３，４－トリメチル１，１－ジオキシドベンゾ［ｂ］チエン－５－イル）（５－ヒドロキシ－１－メチル－１Ｈ－ピラゾル－４－イル）－メタノン（ＣＡＳ　ＲＮ　３４５３６３－９７－５）、イソキサクロルトール（ＣＡＳ　ＲＮ　１４１１１２－０６－３）、イソキサフルトール（ＣＡＳ　ＲＮ　１４１１１２－２９－０）、α－（シクロプロピルカルボニル）－２－（メチルスルホニル）－β－オキソ－４－クロロ－ベンゼンプロパンニトリル（ＣＡＳ　ＲＮ１４３７０１－６６－０）、並びにα－（シクロプロピルカルボニル）－２－（メチルスルホニル）－β－オキソ－４－（トリフルオロメチル）－ベンゼンプロパンニトリル（ＣＡＳ　ＲＮ　１４３７０１－７５－１）。

【００２７】

以下の定義は、式Ｉ及び式ＩＩにおいて使用される用語に適用される。

【００２８】

アルキル部分（単独で、又はアルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル等のより大きな基の部分として）は、直鎖又は分岐鎖であり、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｓｅｃ－ブチル、ｉｓｏ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル又はｎｅｏ－ペンチル等が挙げられる。アルキル基は、好ましくはC_1－C_6アルキル基であり、より好ましくはC_1－C_4であり、そして最も好ましくはメチル基である。

【００２９】

アルケニル及びアルキニル部分（単独で、又はアルケニルオキシ又はアルキニルオキシ等のより大きな基の部分として）は、直鎖又は分岐鎖の形態をとり、そしてアルケニル部分は、必要に応じて、（Ｅ）又は（Ｚ）配位をとってもよい。例として、ビニル、アリル（ａｌｌｙｌ）及びプロパルギルが挙げられる。アルケニル及びアルキニル基は、好ましくは、C_2－C_6アルケニル及びアルキニル基であり、より好ましくはC_2－C_4であり、そして最も好ましくはC_2－C_3アルケニル及びアルキニル基である。

【００３０】

28

好ましくは、アルコキシアルキル基は、２～８個の炭素原子又は酸素原子の長さの鎖を有する。アルコキシアルキル基の例として、２－メトキシ－エチルが挙げられる。

【００３１】

ハロゲンは、一般的に、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素であり、好ましくは、フッ素又は塩素である。ハロアルキルのように、他の用語とつなげられたハロゲンも同様である。

【００３２】

ハロアルキル基は、好ましくは、１～４個の炭素原子の長さの鎖を有する。ハロアルキルは、例えば、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、２，２，２－トリフルオロエチル、２－フルオロエチル、２－クロロエチル、ペンタフルオロエチル、１，１－ジフルオロ－２，２，２－トリクロロエチル、２，２，３，３－テトラフルオロエチル又は２，２，２－トリクロロエチル等が挙げられ；好ましくは、トリクロロメチル、ジフルオロクロロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル又はクロロフルオロメチルである。

【００３３】

ハロアルコキシアルキル基は、好ましくは、２～８個の炭素又は酸素原子の長さの鎖を有する。ハロアルコキシアルキル基の例として、２，２，２－トリフルオロエトキシメチル－が挙げられる。

【００３４】

アルコキシアルコキシ基は、好ましくは、２～８個の炭素又は酸素原子の長さの鎖を有する。アルコキシアルコキシ基の例として：メトキシメトキシ、２－メトキシ－エトキシ、メトキシプロポキシ、エトキシメトキシ、エトキシエトキシ、プロポキシメトキシ及びブトキシブトキシ等が挙げられる。アルコキシアルキル基は、好ましくは１～６個の炭素原子の長さの鎖を有する。アルコキシアルキルの例として、例えば、メトキシメチル、メトキシエチル、エトキシメチル、エトキシエチル、ｎ－プロポキシメチル、ｎ－プロポキシエチル、イソプロポキシメチル又はイソプロポキシエチル等が挙げられる。

【００３５】

アルコキシアルコキシアルキル基は、好ましくは、３～８個の炭素又は酸素原子の長さの鎖を有する。アルコキシアルコキシアルキルの例として：メトキシメトキシメチル、メトキシエトキシメチル、エトキシメトキシメチル及びメトキシエトキシエチル等が挙げられる。

【００３６】

シアノアルキル基は、１つ以上のシアノ基で置換されたアルキル基であり、例えば、シアノメチル又は１，３－ジシアノプロピル等が挙げられる。

【００３７】

シクロアルキル基は、単環式又は二環式であってもよく

29

、任意で１つ以上のメチル基で置換されてもよい。シクロアルキル基は、好ましくは、３～８個の炭素原子、より好ましくは３～６個の炭素原子を有する。単環式シクロアルキル基の例として、シクロプロピル、１－メチルシクロプロピル、２－メチルシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシル等が挙げられる。

【００３８】

本願明細書中で、「アリール」という用語は、単環、二環又は三環であってもよい環系を指す。そのような環の例として、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、インデニル又はフェナンタレニル等が挙げられる。好ましいアリール基は、フェニルである。

【００３９】

「ヘテロアリール」という用語は、１つ以上のヘテロ原子を含み、単環又は２つ以上の環が融合した環で構成される、芳香族環系を指す。好ましくは、単環であれば最大３つ、二環であれば最大４つのヘテロ原子を含み得て、それらのヘテロ原子は、好ましくは、窒素、酸素及び硫黄から選択され得る。そのような基の例として、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、フラニル、チオフェニル、オキサゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、トリアゾリル及びテトラゾリル等が挙げられる。好ましいヘテロアリール基は、ピリジンである。二環基の例として、ベンゾチオフェニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアジアゾリル、キノリニル、シンノリニル（ｃｉｎｎｏｌｉｎｙｌ）、キノキサリニル及びピラゾロ［１，５－ａ］ピリミジニル等が挙げられる。

【００４０】

「ヘテロシクリル」という用語は、ヘテロアリールに加えて、不飽和若しくは部分不飽和類似体を含むものとして定義され、例えば、４，５，６，７－テトラヒドロ－ベンゾチオフェニル、クロメン－４－オニル、９Ｈ－フルオレニル、３，４－ジヒドロ－２Ｈ－ベンゾ－１，４－ジオキセピニル、２，３－ジヒドロ－ベンゾフラニル、ピペリジニル、１，３－ジオキソラニル、１，３－ジオキサニル、４，５－ジヒドロ－イソキサゾリル、テトラヒドロフラニル及びモルホリニル等が挙げられる。

【００４１】

上記方法において、除草剤は、作物が発芽する前に、及び／又は作物が発芽した後に、圃場に施用されてもよいことを理解されたい。好ましい態様において、除草剤は、作物が発芽した後に施用され、これは、「オーバーザトップ（ｏｖｅｒ－ｔｈｅ－ｔｏｐ）」施用と称される。所望の雑草防除を達成するために、必要に応じて、単発又は複数回の施用が行われてもよい。

【００４２】

「雑草」という用語は、任意の望まれない植物を指し、

30

例えば、ダイズ作物の圃場における、キャリーオーバー、又は「意図しない（ｒｏｇｕｅ）」若しくは「自然発生（ｖｏｌｕｎｔｅｅｒ）」作物等が挙げられる。

【００４３】

典型的には、前記ヘテロ接合ポリヌクレオチドは、（ｉ）植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結した（ｉｉ）ＨＳＴ酵素をコードする領域及び（ｉｉｉ）転写終結因子を保有する。典型的には、当該ヘテロ接合ポリヌクレオチドは、更に、葉緑体又はミトコンドリア等の細胞内小器官、好ましくは葉緑体がＨＳＴ酵素の標的となることを可能にするポリペプチドをコードする領域を保有し得る。当該ヘテロポリヌクレオチドは、転写エンハンサー等を更に含み得る。更に、当該ＨＳＴ酵素をコードする領域は、体内でＨＳＴ酵素の発現が必要とされる植物宿主に依存して、「コドン最適化」がなされてもよい。

当業者は、本発明において利用された、植物の作用可能なプロモーター、転写終結因子、葉緑体移行ペプチド、エンハンサー等を、十分に承知している。

【００４４】

前記ＨＳＴは、「野生型」酵素であってもよく、又は除草剤耐性植物の生産に関してより好ましい動力学的特性が得られるように改変されたものであってもよい。好ましい態様において、前記ＨＳＴは、以下のペプチドモチーフ：－

Ｗ－（Ｒ／Ｋ）－Ｆ－Ｌ－Ｒ－Ｐ－Ｈ－Ｔ－Ｉ－Ｒ－Ｇ－Ｔ；及び／又は

Ｎ－Ｇ－（Ｙ／Ｆ）－Ｉ－Ｖ－Ｇ－Ｉ－Ｎ－Ｑ－Ｉ－（Ｙ／Ｆ）－Ｄ；及び／又は

Ｉ－Ａ－Ｉ－Ｔ－Ｋ－Ｄ－Ｌ－Ｐ；及び／又は

Ｙ－（Ｒ／Ｑ）－（Ｆ／Ｗ）－（Ｉ／Ｖ）－Ｗ－Ｎ－Ｌ－Ｆ－Ｙ

を１つ以上含むことを特徴とする。

【００４５】

適切なＨＳＴは、アラビドプシス・サリアナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）、グリシン・マックス（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｍａｘ）、オリザ・サティバ（Ｏｒｙｚａ　ｓａｔｉｖａ）又はクラミドモナス・レインハルドティイ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）に由来する。なおも好ましい態様において、ＨＳＴは、配列番号１～配列番号１０からなる群から選択される。配列番号１～１０において提供されるアミノ酸配列は、葉緑体移行ペプチドをコードする領域を含むＨＳＴアミノ酸配列の例示であることを留意されたい。

【００４６】

配列番号１１～２０は、配列番号１～１０として記載されるＨＳＴをコードするＤＮＡ配列に対応し、一方、配列番号２１～２４は、移行ペプチド領域の無い切断された成熟ＨＳＴ配列をコードするＤＮＡ配列の例示である

。

【００４７】

配列番号２５～２８において提供されるアミノ酸配列は、ＨＰＰＤアミノ酸配列の例示であり、配列番号２９～３２は、それらをコードするＤＮＡ配列である。ＨＰＰＤ阻害除草剤に対する耐性を付与するのに適したＨＰＰＤは、当業者に周知であり、例えばWO　０２／４６３８７が挙げられる。配列番号３３は、TMV翻訳エンハンサーのＤＮＡ配列を提供し、そして、配列番号３４は、５’末端でアラビドプシスＨＳＴをコードするＤＮＡ配列と連結したTMV翻訳エンハンサーのＤＮＡ配列を提供する。

【００４８】

前記方法に使用される作物が、更に、更なる除草剤耐性酵素をコードする更なるヘテロ接合ポリヌクレオチドを保有することを、更に理解されたい。更なる除草剤耐性酵素の例として、例えば、５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸合成酵素（ＥＰＳＰＳ）、グリホセートアセチルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）、シトクロームＰ４５０、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＴ）、アセト乳酸合成酵素（ＡＬＳ）、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（ＰＰＧＯ）、フィトエンデサチュラーゼ（ＰＤ）、ジカンバ分解酵素（例えばWO　０２／０６８６０７）及びアリールオキシ除草剤分解酵素（例えばWO２００７／０５３４８２及びWO２００５／１０７４３７で言及されるもの）からなる群から選択される、除草剤耐性酵素が挙げられる。

【００４９】

上記方法において使用される農薬組成物は、更に、１つ以上の追加の農薬（特に除草剤）を含有してもよく、作物は、当該農薬に対して、本来的に耐性であるか、本明細書中に挙げる１つ以上の追加のトランス遺伝子の発現により抵抗性である。好ましい態様において、１つ以上の追加の除草剤は、グリホセート（その農薬として許容される塩を含む）；グルフォシネート（その農薬として許容される塩を含む）；クロロアセトアニリド、例えばアラクロール、アセトクロール、メトラクトール、Ｓ－メトラクロール；光化学系ＩＩ阻害剤、例えば、アメトリン、アトラジン、シアナジン及びテルブチラジン（ｔｅｒｂｕｔｈｙｌａｚｉｎｅ）等のトリアジン、ヘキサジノン及びメトリブジン等のトリアジノン、並びにクロロトルウロン（ｃｈｌｏｒｏｔｏｌｕｒｏｎ）、ジウロン、イソプロトウロン（ｉｓｏｐｒｏｔｕｒｏｎ）、リンウロン及びテルブチウロン等の尿素等；ＡＬＳ阻害剤、例えば、アミドスルフウロン、クロルスルフウロン、フルピルスルフウロン、ハロスルフウロン、ニコスルフウロン、プリミスルフウロン、プロスルフウロン、リムスルフウロン、トリアスルフウロン、トリフロキシスルフウロン及びトリトスルフウロン等のスルホニル尿素等；ジフェニルエーテル、例えばアシフルロフェン及びフォメサフェン等からなる群から選択される。

【００５０】

本発明は、更に、植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結したＨＳＴ酵素をコードする領域を含む組換えポリヌクレオチドを提供し、ここで、当該ＨＳＴ酵素をコードする領域は、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１４又は配列番号１５において記載されるポリヌクレオチド配列を含まない。好ましい態様において、ＨＳＴ酵素は、配列番号３、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９及び配列番号１０からなる群から選択される。

【００５１】

本発明は、なおも更に、（ｉ）植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結したＨＳＴ酵素をコードする領域、並びに（ｉｉ）植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結した追加の除草剤耐性酵素をコードする領域を含む、１つ以上の追加のヘテロ接合ポリヌクレオチドを含む、組換えポリヌクレオチドを提供する。当該追加の除草剤耐性酵素は、例えば、ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）、５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸合成酵素（ＥＰＳＰＳ）、グリホセートアセチルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）、シトクロームＰ４５０、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＴ）、アセト乳酸合成酵素（ＡＬＳ）、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（ＰＰＧＯ）、フィトエンデサチュラーゼ（ＰＤ）、及びWO　０２／０６８６０７で言及されているジカンバ分解酵素からなる群から選択される除草剤耐性酵素からなる群から選択される。

【００５２】

好ましくは、前記組換えポリヌクレオチドは、（ｉ）植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結したＨＳＴをコードする領域、及び（ｉｉ）植物の作用可能なプロモーターと作用可能に連結したＨＰＰＤをコードする領域を含む。また、当該ポリヌクレオチドが、それぞれ上記で例示した除草剤耐性酵素をコードする、２つ、３つ、又はそれ以上の追加の領域を含む場合もある。故に、他の好ましい態様において、前記組換えポリヌクレオチドは、（ｉ）ＨＳＴ酵素をコードする領域、（ｉｉ）ＨＰＰＤ酵素をコードする領域、及び（ｉｉｉ）グリホセート耐性酵素をコードする領域を含む。

【００５３】

更に、本発明は、本発明の組換えポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【００５４】

更に、本発明は、遺伝子組換えしていない同種植物と比較して、ＨＳＴ阻害除草剤及び／又はＨＰＰＤ阻害除草剤に対する実質的な抵抗性又は実質的な耐性を呈する、ＨＳＴ酵素を過剰発現する遺伝子組換え植物に関する。本発明の形質転換植物は、典型的には、高温及び乾燥耐

性等のストレス耐性の亢進を呈することも留意されたい。

【００５５】

故に、本発明は、更に、遺伝子組換えしていない同種植物細胞と比較して、ＨＳＴ阻害除草剤及び／又はＨＰＰＤ阻害除草剤に対する実質的な抵抗性又は実質的な耐性を呈する、ＨＳＴ酵素を過剰発現する遺伝子組換え植物細胞に関する。当該植物細胞は、上記本発明の組換えポリヌクレオチドを保有する。ＨＳＴをコードする領域及び１つ以上の追加の除草剤耐性酵素をコードする任意の領域は、同一の（「連結」）又は個別の、形質転換組換えポリヌクレオチド分子に含まれて提供され得ることを理解されたい。

【００５６】

更に、前記植物は、遺伝子組換えにより更なる形質、例えば昆虫、真菌及び／又は線虫に対する抵抗性を付与するヘテロ接合ポリヌクレオチドを保有してもよい。

【００５７】

更に、本発明は、本発明の植物細胞を含む、形態的に正常な稔性ＨＳＴ阻害剤耐性植物、植物細胞、組織及び種子を提供する。

【００５８】

形質転換植物又は植物細胞として、限定されないが、農作物、果物及び野菜が挙げられ、例えば、キャノーラ、ヒマワリ、タバコ、サトウダイコン、綿花、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ソルガム、トマト、マンゴー、モモ、リンゴ、ヨウナシ、イチゴ、バナナ、メロン、マンゲルワーゼル（ｍａｎｇｅｌｗｏｒｚｅｌ）、ジャガイモ、人参、レタス、キャベツ、タマネギ等が挙げられる。特に好ましい遺伝子改変植物は、ダイズ植物、サトウキビ、エンドウ、農芸用のマメ、一般的なブドウ、柑橘類、アルファルファ、ライ、オーツ、芝生及び飼料草、亜麻及び菜種、並びに既に述べたもの以外の木の実を生じる植物である。本方法の特に好ましい態様において、前記植物は、双子葉植物であり、好ましくは、キャノーラ、ヒマワリ、タバコ、サトウダイコン、ダイズ、綿花、ソルガム、トマト、マンゴー、モモ、リンゴ、ヨウナシ、イチゴ、バナナ、メロン、ジャガイモ、人参、レタス、キャベツ、タマネギであり、特に好ましくは、ダイズである。更に好ましい態様において、上記植物は、トウモロコシ又はイネである。好ましくは、本発明の植物は、ダイズ、イネ又はトウモロコシである。また、本発明には、上記の植物の子孫、並びに、そのような植物及び子孫の種子又は他の育苗材料が含まれる。

【００５９】

特に好ましい側面において、本発明の組換えポリヌクレオチドは、式Ｉａ又はＩｇの化合物からなる群から選択されるＨＰＰＤ化学のクラスのＨＰＰＤ阻害除草剤による傷害から、ダイズ作物を保護するために使用される。更なる態様において、当該ＨＰＰＤ阻害除草剤は、スルコトリオン、メソトリオン、テンボトリオン、並びに、Ｘが窒素であり、R_4 がＣＦ$_3$ 、ＣＦ$_2$ Ｈ又はＣＦＨ$_2$ であり、並びに／又はR_1 及びR_2 が一緒にエチレンの橋を形成する、式Ｉａの化合物から選択される。

【００６０】

なおも更に、本発明は、植物材料を、ＨＳＴ酵素をコードする領域を保有する組換えポリヌクレオチドで形質転換する工程、当該形質転換した植物材料を、ＨＳＴ阻害剤及び／又はＨＰＰＤ阻害剤を使用して選択する工程、当該材料を形態的に正常な稔性植物に再生させる工程を含む、ＨＳＴ阻害及び／又はＨＰＰＤ阻害除草剤に耐性の遺伝子組換え植物を生産する方法を提供する。好ましい態様において、当該形質転換植物材料は、ＨＳＴ阻害除草剤を、単独で、又はＨＰＰＤ阻害除草剤と組み合わせて使用して選択される。

【００６１】

更に、本発明は、ＨＳＴ酵素をコードする領域を植物の形質転換の選択マーカーとして保有する、組換えポリヌクレオチドの使用、及び、ＨＳＴの阻害により全体的に又は部分的に機能する除草剤に耐性を有する植物の生産における、ＨＳＴ酵素をコードする領域を保有する組換えポリヌクレオチドの使用に関する。

【００６２】

なおも更に、本発明は、植物形質転換における選択剤としてのＨＳＴ阻害剤の使用、及び潜在的な除草剤のインビトロスクリーニングにおける組換えＨＳＴ酵素の使用に関する。

【００６３】

なおも更に、本発明は、ＨＰＰＤ阻害除草剤（上記で定義した）、及びＨＳＴ阻害除草剤（上記で定義した）を含有する、除草組成物、好ましくは相乗的な除草組成物を提供する。当該組成物中のＨＰＰＤ阻害除草剤とＨＳＴ阻害除草剤との比率は、任意の適切な比率をとり、典型的には、１００：１～１：１００、好ましくは１：１０～１：１００、なおもより好ましくは１：１～１：２０である。当業者は、最適な比率が、日常的な実験の最適化の事項としてもたらされ得る、２つの除草剤の相対的な強度及び範囲に依存するであろうことを認識し得る。

【００６４】

前記除草組成物は、更に、１つ以上の追加の農薬成分を含有する場合もある。当該追加の農薬として、例えば、除草剤、殺真菌剤又は殺虫剤（例えばチオメトキサム）等が挙げられるが、除草剤が好ましい。故に、当該追加の除草剤は、好ましくは、グリホセート（その農薬として許容される塩を含む）；グルフォシネート（その農薬として許容される塩を含む）；クロロアセトアニリド、例えばアラクロール、アセトクロール、メトラクトール、Ｓ－メトラクロール；光化学系ＩＩ（ＰＳ－ＩＩ）阻害剤、例えば、アメトリン、アトラジン、シアナジン及

びテルブチラジン等のトリアジン、ヘキサジノン及びメトリブジン等のトリアジノン、並びにクロロトルウロン（ｃｈｌｏｒｏｔｏｌｕｒｏｎ）、ジウロン、イソプロトウロン（ｉｓｏｐｒｏｔｕｒｏｎ）、リンウロン及びテルブチウロン等の尿素等；ＡＬＳ阻害剤、例えば、アミドスルフウロン、クロルスルフウロン、フルピルスルフウロン、ハロスルフウロン、ニコスルフウロン、プリミスルフウロン、プロスルフウロン、リムスルフウロン、トリアスルフウロン、トリフロキシスルフウロン及びトリトスルフウロン等のスルホニル尿素等；ジフェニルエーテル、例えばアシフルロフェン及びフォメサフェン等からなる群から選択される。ＰＳ－ＩＩ除草剤は、そのような混合物が特に良好な効率を呈するようにするのに特に好ましい。

【００６５】

故に、本発明は、なおも更に、雑草を防除する量の上記で定義した相乗的な除草組成物を圃場に施用することを含む、作物及び雑草が生育する圃場で選択的に雑草を防除する方法を提供する。本発明の更なる態様において、ＨＰＰＤ及びＨＳＴ阻害除草剤は、混合物として同時に施用されるのではなく、連続的な噴霧により施用される。故に、例えば、本発明の雑草防除の計画において、ＨＳＴ除草剤は、ＨＰＰＤ除草剤が既に予め施用された作物の圃場に施用されるのが有利であり得る。通常、当該連続的施用は同一の季節において行われるが、特に、より持続的なＨＰＰＤ除草剤の場合は、ＨＳＴ阻害除草剤が、後の季節に施用される場合もある。加えて、ＨＳＴ阻害除草剤は、ＨＰＰＤ阻害除草剤が１つの季節のより早期に、又は前の季節に施用されさえする、雑草防除の計画の部分として使用されるのが有利である。

【００６６】

前記ＨＰＰＤ阻害除草剤は、例えば１～１０００ｇ／ｈａ、より好ましくは２～２００ｇ／ｈａ等の、任意の適切な割合で圃場に施用されてもよい。同様に、当該ＨＳＴ阻害除草剤は、例えば１０～２０００ｇ／ｈａ、より好ましくは５０～４００ｇ／ｈａ等の、任意の適切な割合で施用されてもよい。

【００６７】

他の態様において、前記ＨＰＰＤ阻害除草剤は、他の除草剤の非存在下で施用された場合に雑草に対して致死未満量（ｓｕｂ－ｌｅｔｈａｌ）となる割合で、圃場に施用される。実際の致死未満量の割合は、存在している雑草の種類及び実際のＨＰＰＤ阻害剤に依存し得るが、典型的には、５０ｇ／ｈａ未満であり、好ましくは１０ｇ／ｈａ未満である。

故に、本発明は、更に、ＨＳＴ阻害除草剤の雑草防除効率を増大させるための、致死未満量のＨＰＰＤ阻害除草剤の使用を提供する。

【００６８】

本発明は、更に、以下の非限定的な実施例及び配列表から、更に明確になるであろう。

【００６９】

配列表

【表１】

配列表

配列番号１　アラビドプシス(Arabidopsis) HSTアミノ酸配列

```
melsisqsprvrfsslaprflaashhhrpsvhlagkfislprdvrftslstsrmrsk
fvstnyrkisiracsqvgaaesddpvldriarfqnacwrflrphtirgtalgstalv
tralienthlikwslvlkalsgllalicgngyivginqiydigidkvnkpylpiaag
dlsvqsawllviffaiaglvvgfnfgpfitslyslglflgtiysvpplrmkrfpva
afliiatvrgfllnfgvyhatraalglpfqwsapvafitsfvtlfalviaitkdlpd
vegdrkfqistlatklgvrniaflgsglllvnyvsaislafympqvfrgslmipahv
ilasglifqtwvlekanytkeaisgyyrfiwnlfyaeyllfpfl
```

配列番号２　イネHSTアミノ酸配列

```
maslaspplpcraaatasrsgrpaprllgpppppaspllssasarfprapcnaarws
rrdavrvcsqagaagpaplsktlsdlkdscwrflrphtirgtalgsmslvaralien
pqlinwwlvfkafyglvalicgngyivginqiydiridkvnkpylpiaagdlsvqta
wllvvlfaaagfsivvtnfgpfitslyclglflgtiysvppfrlkrypvaafliiat
vrgfllnfgvyyatraalgltfqwsspvafitcfvtlfalviaitkdlpdvegdrky
qistlatklgvrniaflgsglllanyvaaiavaflmpqafrrtvmvpvhaalavgii
fqtwvleqakytkdaisqyyrfiwnlfyaeyiffpli
```

配列番号３　イネHST変異体アミノ酸配列

```
maslaspplpcraaatasrsgrpaprllgpppppaspllssasarfprapcnaarws
rrdavrvcsqagaagpaplsktlsdlkdscwrflrphtirgtalgsialvaralien
pqlinwwlvfkafyglvalicgngyivginqiydiridkvnkpylpiaagdlsvqta
wllvvlfaaagfsivvtnfgpfitslyclglflgtiysvppfrlkrypvaafliiat
vrgfllnfgvyyatraalgltfqwsspvafitcfvtlfalviaitkdlpdvegdrky
qistlatklgvrniaflgsglllanyvaaiavaflmpqafrrtvmvpvhaalavgii
fqtwvleqakytkdaisqyyrfiwnlfyaeyiffpli
```

配列番号４　ダイズHSTアミノ酸配列

```
melslsptshrvpstiptlnsaklsstkatksqqplflgfskhfnsiglhhhsyrcc
snavperpqrpssiractgvgasgsdrplaerlldlkdacwrflrphtirgtalgsf
alvaralientnlikwslffkafcglfalicgngyivginqiydisidkvnkpylpi
aagdlsvqsawflviffaaaglsiaglnfgpfifslytlglflgtiysvpplrmkrf
pvaafliiatvrgfllnfgvyyatraslglafewsspvvfittfvtffalviaitkd
lpdvegdrkyqistfatklgvrniaflgsgillvnyivsvlaaiympqafrrwllip
ahtifaisliyqarileqanytkdaisgfyrfiwnlfyaeyaifpfi
```

配列番号５　クラミドモナス(Chlamydomonas) HSTアミノ酸配列

【表２】

```
mdlcsstgrgaclspastsrpcpapvhlrgrrlafspaqpagrrhlpvlssaavpap
lpnggndesfaqklanfpnafwkflrphtirgtilgttavtakvlmenpgcidwall
pkallglvallcgngyivginqiydvdidvvnkpflpvasgelspalawglclslaa
agagivaanfgniitslytfglflgtvysvpplrlkqyavpafmiiatvrgfllnfg
vysatraalglpfewspavsfitvfvtlfatviaitkdlpdvegdqannistfatrm
gvrnvallaigllmanylgaialaltystafnvplmagahailaatlalrtlklhaa
sysreavasfyrwiwnlfyaeyallpfl
```

配列番号６　ニコチニア(Nicotinia) HSTアミノ酸配列

```
melacssclsrfssvlthqdtaasryrklpptspsckaanfvlkssknlsssaglh
igytnfsktvsyrkyrhisiracsqvgtagsepvldklsqfkdafwrflrphtirgt
algslslvtralienpnlirwslamkafsglialicgngyivginqiydigidkvnk
pylpiaagdlsvqsawflvllfamagllivginfgpfitslyclglflgtiysvppf
rmkrfavvafliiatvrgfllnygvyyattaalglsfqwsspvafittfvtlfalvi
aitkdlpdvegdrkfqistlatklgvrniaflgsglllanyigavvaaiympqafrs
slmipvhailalclvfqawllekanytkeaisayyqfiwnffyaeylifpfi
```

配列番号７　アクイレギア(Aquilegia) HSTアミノ酸配列

```
lcfsspsisipphcsttthyrkipinstfkstnflskasnnlttfgfsrnkkysrsi
lsrksrhfsiwassqvgaagsddpllkkipdfkdavwrflrphtirgtalgsialvs
ralienthlikwslllfkaicgvfalmcgngyivginqiydigidkvnkpylpiaagd
lsvqsawslvtffavagvcivafnfgpfitslyclglflgtiysvpplrmkrypvaa
fliiatvrgfllnfgvyhatraalgltfewsypvafittfvtmfalviaitkdlpdv
egdrkfqistlatklgvrniallgtgllanyigaivaaiylpqafrrnlmipahti
lalglvfqawaleqakyskeaildfyrfvwnlfyseyflfpfi
```

配列番号８　ブラシカ･ナプス(Brassica napus) HSTアミノ酸配列

```
melsishspclrfsssssprflaasshhyrpsvhlagkllsrskdadltslssscmrs
kfvstnyrkisirassqvgaagsdpvldrlarfqnacwrflrphtirgtalgstalv
tralienthlikwslvlkalsgllalicgngyivginqiydigidkvnkpylpiaag
dlsvqsawllviffaiagltvvgfnfgpfitclyslglflgtiysvppfrmkrfpva
afliiatvrgfllnfgvyhatraalglsfqwsapvafitsfvtlfalviaitkdlpd
vegdrkfqistlatklgvrniaflgsglllvnyisaislafympqvfrgslmipahm
ilasclvfqtwvlekanytkeaiagyyrfiwnlfyaeyllfpff
```

配列番号９　ウィティス・ウィニフェラ(Vitis vinifera) HSTアミノ酸配列

```
mkvdavqastqvgaagsdpplnkfsvfkdacwrflrphtirgtalgstalvaralie
npnlikwslllfkafsgllalicgngyivginqiydisidkvnkpylpiaagdlsvqs
awflvlffavagvlivgsnfgsfitslyclglvlgtiysvppfrmkrfpvaafliia
tvrgfllnfgvyyatraalglpfmwsapvvfittfvtlfalviaitkdlpdvegdrk
```

【表３】

yqistlatklgvrniaflgsglllvnyigsilaaiympqafrlslmipahailaagl
ifqarvleqanytkeaisdfyrfiwnlfyveyiifpfi

配列番号10　フィスコミトレラ・パテンス(Physcomitrella patens)HST配列

mgltaivvdvaqasssvalsqgrgatrrlpgglalgdafkglrkreyaqglqcrvr
reggcasearvwkvrcssdsagslggdlpasqpqqsevsgirdpaaasaasfaplpq
rialfydafwrflrphtirgtflgtsalvtrallenptlinwallpkalrgllallc
gngfivginqifdsgidkvnkpflpiaagdlsvpaawalvggllaalgvglvatnfgp
littlytfglflgtiysvpplrlkqypvpafmiiatvrgfllnfgvyyatraalgls
yewspsvmfitifvtlfatviaitkdlpdiegdkkfnistfatnlgvrkisflgagl
llvnyigaivaafylpqafktkimvtghavlglsliyqtwlldtakyskeaisnfyr
fiwnlfyseyalfpfi

配列番号11　アラビドプシス(Arabidopsis)HST(DNA)

atggagctctcgatctcacaatcaccgcgtgttccggttctcgtctctggcgcctcgt
ttcttagcagcttctcatcatcatcgtccttctgtgcatttagctgggaagtttata
agcctccctcgagatgttcgcttcacgagcttatcaacttcaagaatgcggtccaaa
tttgtttcaaccaattatagaaaaatctcaatccgggcatgttctcaggttggtgct
gctgagtctgatgatccagtgctggatagaattgcccggttccaaaatgcttgctgg
agatttcttagacccatacaatccgcggaacagctttaggatccactgccttggtg
acaagagctttgatagagaacactcatttgatcaaatggagtcttgtactaaaggca
ctttcaggtcttcttgctcttatttgtgggaatggttatatagtcggcatcaatcag
atctacgacattggaatcgacaaagtgaacaaaccatacttgccaatagcagcagga
gatctatcagtgcagtctgcttggttgttagtgatatttttttgcgatagcagggctt
ttagttgtcggatttaactttggtccattcattacaagcctatactctcttggcctt
tttctgggaaccatctattctgttccacccctcagaatgaaaagattcccagttgca
gcatttcttattattgccacggtacgaggttttccttcttaaccttggtgtgtaccat
gctacaagagctgctcttggacttccatttcagtggagtgcacctgtggcgttcatc
acatctttgtgacactgtttgcactggtcattgctattacaaaggaccttcctgat
gttgaaggagatcgaaagttccaaatatcaaccctggcaacaaaacttggagtgaga
aacattgcattcctcggttctggacttctgctagtaaattatgtttcagccatatca
ctagctttctacatgcctcaggttttagaggtagcttgatgattcctgcacatgtg
atcttggcttcaggcttaattttccagacatgggtactagaaaaagcaaactacacc
aaggaagctatctcaggatattatcggtttatatggaatctcttctacgcagagtat
ctgttattccccttcctctag

配列番号12　イネHST(DNA)

atggcttccctcgcctcccctcctctcccctgccgcgccgccgccaccgccagccgc
agcgggcgtcctgctccgccgcctcctcggcctccgccgccgccgccgctccctctc
ctctcctccgcttcggcgcgcttcccgcgtgcccccctgcaacgccgcacgctggagc
cggcgcgacgccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca

【表４】

attcgaggaactgccttgggatccatgtcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaactgataaattggtggttggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcgtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccaattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattggtggtattatttgcagctgcgggatttttcaattgtttgtgacaaacttt
ggacctttcattacctctctatattgccttggtctatttcttggcaccatatactct
gttcctccattcagacttaagagatatcctgttgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtggttttcttctcaactttggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctcgcctgttgctttcattacatgcttcgtgacttttattt
gctttggtcattgctataaccaaagatctcccagatgttgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcggtgtcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatgttgctgctattgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaatggtgcctgtgcatgctgcccttgccgttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatatctaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgata

配列番号13　イネHST変異体(DNA)

atggcttccctcgcctcccctcctctcccctgccgcgccgccgccaccgccagccgc
agcgggcgtcctgctccgccgcctcctcggcccctccgccgccgccgctccctctc
ctctcctccgcttcggcgcgcttcccgcgtgcccccctgcaacgccgcacgctggagc
cggcgcgacgccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacataca
attcgaggaactgccttgggatccatagcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaactgataaattggtggttggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcgtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccaattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattggtggtattatttgcagctgcgggatttttcaattgtttgtgacaaacttt
ggacctttcattacctctctatattgccttggtctatttcttggcaccatatactct
gttcctccattcagacttaagagatatcctgttgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtggttttcttctcaactttggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctcgcctgttgctttcattacatgcttcgtgacttttattt
gctttggtcattgctataaccaaagatctcccagatgttgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcggtgtcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatgttgctgctattgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaatggtgcctgtgcatgctgcccttgccgttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatatctaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatatag

配列番号14　ダイズHST(DNA)

tctgctaaattatcttctactaaagctactaaatctcaacaacctttatttttagga
ttttctaaacattttaattctattggattacatcatcattcttatagatgttgttct
aatgctgtacctgaaagacctcaagacctttcttctattagagcttgtactggagta
ggagcttctggatctgatagacctttagctgaaagattattagatttaaaagatgct
tgttggagatttttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatcttttgct
ttagtagctagagctttaattgaaaatactaatttaattaaatggtctttatttttt

【表５】

aaagctttttgtggattatttgctttaatttgtggaaatggatatattgtaggaatt
aatcaaatttatgatatttctattgataaagtaaataaaccttatttacctattgct
gctggagatttatctgtacaatctgcttggtttttagtaatttttttttgctgctgct
ggattatctattgctggattaaatttttggaccttttatttttttctttatatacttta
ggattatttttaggaactatttattctgtacctcctttaagaatgaaaagatttcct
gtagctgctttttttaatttattgctactgtaagaggatttttattaaatttttggagta
tattatgctactagagcttctttaggattagcttttgaatggtcttctcctgtagta
tttattactactttttgtaacttttttttgctttagtaattgctattactaaagattta
cctgatgtagaaggagatagaaaatatcaaatttctacttttgctactaaattagga
gtaagaaatattgctttttttaggatctggaattttattagtaaattatattgtatct
gtattagctgctatttatatgcctcaagcttttagaagatggttattaattcctgct
catactatttttgctatttctttaatttatcaagctagaatttttagaacaagctaat
tatactaaagatgctatttctggatttttatagatttatttggaatttattttatgct
gaatatgctatttttccttttatt

配列番号15　クラミドモナス(Chlamydomonas)HST(DNA)

atggacctttgcagctcaactggaagaggagcatgcctttcgccggcatccacgtcg
cggccgtgcccagcaccagtgcatttgcgcggccgacgcctggctttctctccggct
cagcctgctggacgggcgccacttgccggtgctctcatctgcagcggtccccgctccc
ctcccaaatggtggaaacgacgagagcttcgcacaaaaactggctaactttccaaac
gccttctggaagttcctgcggccacacaccatccgggggactatcctgggcaccaca
gctgtgaccgccaaggtccttatggagaaccccggctgcatagactgggcactgctg
ccgaaggcgctgctcggcctggtggcgctgctgtgcggcaacggctacattgtgggc
atcaaccaaatctacgacgtcgacattgacgtggtcaacaagccattcctccccgtg
gcgtcgggcgagctgtcgccggcgctggcgtgggggcctgtgtctgtcgctggcggct
gcgggcgcgggcatcgtagccgccaacttcggcaacctcatcaccagcctctacacc
tttggcctcttcctgggcaccgtgtacagtgtgcctcccctgcgcctgaagcagtac
gcggtgccggcttcatgatcatcgccacggtgcgcggctcctgctcaacttcggc
gtgtacagcgccacgcgggcggcactgggactgcccttcgagtggagcccggccgtc
agcttcatcacggtgtttgtgacgctgtttgccactgtgatcgccatcaccaaggac
ctgccggacgtggagggcgaccaggccaacaacatctccaccttcgccacgcgcatg
ggcgtgcgcaacgtggcactgctggccatcggccttctcatggccaactacctgggt
gccatcgcgctggcactcacctactccaccgccttcaacgtgccgctcatggcgggc
gcgcacgccatcctggccgccacgctggcgctgcgcacgctcaagctgcacgccgcc
agctacagccgggaggcggtggcgtccttctaccgctggatctggaacctgttctac
gccgagtacgcgctgctgccgttcctgtag

配列番号16　ニコチニア(Nicotinia)HST　DNA

atggaattagcttgttcttcttgttcttctttaagattttcttctgtattaactcat
caagatactgctgcttctagatatagaaaattacctcctacttctccttcttgtaaa
gctgctaattttgtattaaaatcttctaaaaatttatcttcttctgctggattacat
attggatatactaatttttctaaaactgtatcttatagaaaatatagacatatttct
attagagcttgttctcaagtaggaactgctggatctgaacctgtattagataaatta
tctcaatttaaagatgctttttggagatttttaagacctcatactattagaggaact

【表６】

gctttaggatctttatctttagtaactagagctttaattgaaaatcctaatttaatt
agatggtctttagctatgaaagcttttctggattaattgctttaatttgtggaaat
ggatatattgtaggaattaatcaaatttatgatattggaattgataaagtaaataaa
ccttatttacctattgctgctggagatttatctgtacaatctgcttggtttttagta
ttattatttgctatggctggattattaattgtaggaattaattttggacctttatt
acttctttatattgtttaggattatttttaggaactatttattctgtacctccttt
agaatgaaaagatttgctgtagtagctttttttaattattgctactgtaagaggattt
ttattaaattatggagtatattatgctactactgctgctttaggattatctttttcaa
tggtcttctcctgtagcttttattactattttgtaactttatttgctttagtaatt
gctattactaaagatttacctgatgtagaaggagatagaaaatttcaaatttctact
ttagctactaaattaggagtaagaaatattgctttttaggatctggattattatta
gctaattatattggagctgtagtagctgctatttatatgcctcaagcttttagatct
tctttaatgattcctgtacatgctatttagctttatgtttagtatttcaagcttgg
ttattagaaaaagctaattatactaaagaagctatttctgcttattatcaatttatt
tggaatttttttttatgctgaatatttaatttttccttttatt

配列番号17　アクイレギア(Aquilegia)HST　DNA

atgttatgttttttcttctccttctatttctattcctcctcattgttctactactact
cattatagaaaaattcctattaattctacttttaaatctactaatttttttatctaaa
gcttctaataatttaactactttggatttttctagaaaataaaaaatattctagatct
attttatctagaaaatctagacatttttctatttgggcttcttctcaagtaggagct
gctggatctgatgatccttttattaaaaaaaattcctgattttaaagatgctgtatgg
agattttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatctattgctttagta
tctagagctttaattgaaaatactcatttaattaaatggtctttatattttaaagct
atttgtggagtatttgctttaatgtgtggaaatggatatattgtaggaattaatcaa
atttatgatattggaattgataaagtaaataaacctttatttacctattgctgctgga
gatttatctgtacaatctgcttggtctttagtaacttttttgctgtagctggagta
tgtattgtagcttttaatttttggaccttttattacttctttatattgtttaggatta
tttttaggaactatttattctgtacctccttttaagaatgaaaagatatcctgtagct
gcttttttaattattgctactgtaagaggatttttattaaatttttggagtatatcat
gctactagagctgctttaggattaacttttgaatggtcttatcctgtagcttttatt
actacttttgtaactatgtttgcttttagtaattgctattactaaagatttacctgat
gtagaaggagatagaaaatttcaaatttctacttttagctactaaattaggagtaaga
aatattgctttattaggaactggattattattagctaattatattggagctattgta
gctgctatttatttacctcaagcttttagaagaaatttaatgattcctgctcatact
attttagctttaggattagtatttcaagcttgggctttagaacaagctaaatattct
aaagaagctattttagatttttatagatttgtatggaatttattttattctgaatat
ttttttatttccttttatt

配列番号18　ブラシカ・ナプス(Brassica napus)HST　DNA

ttagctgcttcttctcatcattatagaccttctgtacatttagctggaaaattatta
tctagatctaaagatgctgatttaacttctttatcttcttctttgtatgagatctaaa
tttgtatctactaattatagaaaaatttctattagagcttcttctcaagtaggagct
gctggatctgatcctgtattagatagattagctagatttcaaaatgcttgttggaga
tttttaagacctcatactattagaggaactgctttaggatctactgctttagtaact

【表７】

agagctttaattgaaaatactcatttaattaaatggtctttagtattaaaagcttta
tctggattattagctttaatttgtggaaatggatatattgtaggaattaatcaaatt
tatgatattggaattgataaagtaaataaaccttatttacctattgctgctggagat
ttatctgtacaatctgcttggttattagtaatttttttgctattgctggattaact
gtagtaggatttaatttttggacctttattacttgtttatattctttaggattattt
ttaggaactatttattctgtacctccttttagaatgaaaagatttcctgtagctgct
tttttaattattgctactgtaagaggatttttattaaatttttggagtatatcatgct
actagagctgctttaggattatcttttcaatggtctgctcctgtagcttttattact
tcttttgtaactttatttgctttagtaattgctattactaaagatttacctgatgta
gaaggagatagaaaatttcaaatttctacttagctactaaattaggagtaagaaat
attgctttttttaggatctggattattattagtaaattatatttctgctatttcttta
gctttttatatgcctcaagtatttagaggatctttaatgattcctgctcatatgatt
ttagcttcttgtttagtatttcaaacttgggtattagaaaaagctaattatactaaa
gaagctattgctggatattatagatttatttggaatttatttttatgctgaatattta
ttatttccttttttt

配列番号19　ウィティス･ウィニフェラ(Vitis vinifera)HST　DNA

atgaaagtagatgctgtacaagcttctactcaagtaggagctgctggatctgatcct
cctttaaataaatttttctgtatttaaagatgctttgttggagatttttaagacctcat
actattagaggaactgctttaggatctactgctttagtagctagagctttaattgaa
aatcctaatttaattaaatggtctttattattttaaagcttttctggattattagct
ttaatttgtggaaatggatatattgtaggaattaatcaaatttatgatatttctatt
gataaagtaaataaaccttatttacctattgctgctggagatttatctgtacaatct
gcttggtttttagtattatttttgctgtagctggagtattaattgtaggatctaat
tttggatcttttattacttctttatattgtttaggattagtattaggaactatttat
tctgtacctccttttagaatgaaaagatttcctgtagctgctttttaattattgct
actgtaagaggatttttattaaatttggagtatattatgctactagagctgcttta
ggattacctttatgtggtctgctcctgtagtatttattactactttgtaacttta
tttgctttagtaattgctattactaaagatttacctgatgtagaaggagatagaaaa
tatcaaatttctactttagctactaaattaggagtaagaaatattgctttttttagga
tctggattattattagtaaattatattggatctattttagctgctatttatatgcct
caagcttttagattatctttaatgattcctgctcatgctatttttagctgctggatta
atttttcaagctagagtattagaacaagctaattatactaaagaagctatttctgat
ttttatagatttatttggaatttatttttatgtagaatatattatttttccttttatt

配列番号20　フィスコミトレラ･パテンス(Physcomitrella patens)HST DNA

atgggattaactgctattgtagtagatgtagctcaagcttcttcttcttctgtagct
ttatctcaaggaagaggagctactagaagattacctggaggattagctttaggagat
gcttttaaaggattaagaaaaagagaatatgctcaaggattacaatgtagagtaaga
agagaaggaggatgtgcttctgaagctagagtatggaaagtaagatgttcttctgat
tctgctggatctttaggaggagatttacctgcttctcaacctcaacaatctgaagta
tctggaattagagatcctgctgctgcttctgctgcttcttttgctcctttacctcaa
agaattgctttatttttatgatgcttttggagatttttaagacctcatactattaga
ggaacttttttaggaacttctgctttagtaactagagctttattagaaaatcctact
ttaattaattgggctttattacctaaagctttaagaggattattagctttattatgt

【表８】

ggaaatggatttattgtaggaattaatcaaatttttgattctggaattgataaagta
aataaaccttttttacctattgctgctggagatttatctgtacctgctgctttgggct
ttagtaggaggattagctgctttaggagtaggattagtagctactaatttttggacct
ttaattactactttatatactttttggattatttttaggaactatttattctgtacct
cctttaagattaaaacaatatcctgtacctgcttttatgattattgctactgtaaga
ggatttttattaaatttttggagtatattatgctactagagctgctttaggattatct
tatgaatggtctccttctgtaatgtttattactatttttgtaactttatttgctact
gtaattgctattactaaagatttacctgatattgaaggagataaaaaatttaatatt
tctacttttgctactaatttaggagtaagaaaaatttctttttttaggagctggatta
ttattagtaaattatattggagctattgtagctgcttttttatttacctcaagctttt
aaaactaaaattatggtaactggacatgctgtattaggattatctttaatttatcaa
acttggttattagatactgctaaatattctaaagaagctatttctaatttttatagа
tttatttggaatttatttattctgaatatgctttatttccttttatt

配列番号21　DNAコード成熟アラビドプシス(Arabidopsis)HST

agaaaaatctcaatccgggcatgttctcaggttggtgctgctgagtctgatgatcca
gtgctggatagaattgccccggttccaaaatgcttgctggagatttcttagaccccat
acaatccgccggaacagctttaggatccactgccttggtgacaagagctttgatagag
aacactcatttgatcaaatggagtcttgtactaaaggcactttcaggtcttcttgct
cttatttgtgggaatggttatatagtcggcatcaatcagatctacgacattggaatc
gacaaagtgaacaaaccatacttgccaatagcagcaggagatctatcagtgcagtct
gcttggttgttagtgatatttttgcgatagcagggctttttagttgtcggatttaac
tttggtccattcattacaagcctatactctcttggccttttctgggaaccatctat
tctgttccacccctcagaatgaaaagattcccagttgcagcatttcttattattgcc
acggtacgaggtttccttcttaactttggtgtgtaccatgctacaagagctgctctt
ggacttccatttcagtggagtgcacctgtggcgttcatcacatcttttgtgacactg
tttgcactggtcattgctattacaaaggaccttcctgatgttgaaggagatcgaaag
ttccaaatatcaaccctggcaacaaaacttggagtgagaaacattgcattcctcggt
tctggacttctgctagtaaattatgtttcagccatatcactagctttctacatgcct
caggtttttagaggtagcttgatgattcctgcacatgtgatcttggcttcaggctta
attttccagacatgggtactagaaaaagcaaactacaccaaggaagctatctcagga
tattatcggttatatggaatctcttctacgcagagtatctgttattcccctcctc
ta

配列番号22　DNAコード成熟イネHST

cggcgcgacgccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacatata
attcgaggaactgccttgggatccatgtcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaactgataaattggtggttggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcgtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccaattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattggtggtattatttgcagctgcgggatttttcaattgttgtgacaaacttt
ggaccttttcattacctctctatattgccttggtctatttcttggcaccatatactct
gttcctccattcagacttaagagatatcctgttgctgcttttcttatcattgcaacg

【表９】

gtccgtggttttcttctcaactttggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctcgcctgttgctttcattacatgcttcgtgactttattt
gctttggtcatttgctataaccaaagatctcccagatgttgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcggtgtcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatgttgctgctattgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaatggtgcctgtgcatgctgcccttgccgttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatatactaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatatag

配列番号23　DNAコード成熟イネ変異HST

cggcgcgacgccgtgcgggtttgctctcaagctggtgcagctggaccagccccatta
tcgaagacattgtcagacctcaaggattcctgctggagatttttacggccacatata
attcgaggaactgccttgggatccatagcattagttgctagagctttgatagagaac
ccccaactgataaattggtggttggtattcaaagcgttctatgggctcgtggcgtta
atctgtggcaatggttacatcgttgggatcaatcagatctatgacattagaatcgat
aaggtaaacaagccatatttaccaattgctgccggtgatctctcagttcagacagca
tggttattggtggtattatttgcagctgcgggatttttcaattgttgtgacaaacttt
ggaccttttcattacctctctatattgccttggtctatttcttggcaccatatactct
gttcctccattcagacttaagagatatcctgttgctgcttttcttatcattgcaacg
gtccgtggttttcttctcaactttggtgtgtactatgctactagagcagcactgggt
cttacattccaatggagctcgcctgttgctttcattacatgcttcgtgactttattt
gctttggtcatttgctataaccaaagatctcccagatgttgaaggggatcggaagtat
caaatatcaactttggcgacaaagctcggtgtcagaaacattgcatttcttggctct
ggtttattgatagcaaattatgttgctgctattgctgtagcttttctcatgcctcag
gctttcaggcgcactgtaatggtgcctgtgcatgctgcccttgccgttggtataatt
ttccagacatgggttctggagcaagcaaaatatactaaggatgctatttcacagtac
taccggttcatttggaatctcttctatgctgaatacatcttcttcccgttgatatag

配列番号24　DNAコード昆虫細胞コドン最適化成熟アラビドプシス(Arabidopsis)HST

gggatccctcgtgcttgctcccaggtcggcgctgctgagtccgacgaccccgtgctg
gaccgtatcgctcgtttccagaacgcttgctggcgtttcctgcgtccccacaccatc
cgtggcaccgctctgggttccaccgccctggtgacccgtgctctgatcgagaacacc
cacctgatcaagtggtccctggtgctgaaggctctgtccggtctgctggctctgatc
tgcggtaacggttacatcgtgggtatcaaccagatctacgacatcggtatcgacaag
gtgaacaagccctacctgcccatcgctgctggtgacctgtccgtgcagtccgcttgg
ctgctggtcatcttcttcgctatcgctggtctgctggtcgtgggtttcaacttcggt
cccttcatcacttccctgtactcccctgggcctgttcctgggcaccatctactccgtg
ccccccctgcgtatgaagcgtttccccgtggctgctttcctgatcatcgctaccgtg
cgtggtttcctgctgaacttcggtgtctaccacgctacccgtgctgctctgggtctg
cccttccagtggtccgctcccgtggctttcatcaccagcttcgtgaccctgttcgct
ctggtgatcgctatcaccaaggacctgcccgacgtggagggtgaccgtaagttccag

【表１０】

atctccaccctggctaccaagctgggtgtgcgtaacatcgctttcctcggttccggc
ctgctgctcgtgaactacgtgtccgctatctccctggctttctacatgccccaggtg
ttccgtggttcccctgatgatccccgctcacgtgatcctggcttccggtctgatcttc
cagacctgggtgctcgagaaggctaactacaccaaggaagctatctccggttactac
cgcttcatctggaacctgttctacgctgagtacctgctgttccccttcctgtaa

配列番号25　シュードモナス･フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)87-79株由来HPPD a/a配列

madqyenpmglmgfefiefasptpgtlepifeimgftkvathrsknvhlyrqgeinl
ilnnqpdslasyfaaehgpsvcgmafrvkdsqqaynralelgaqpihietgpmelnl
paikgiggaplylidrfgegssiydidfvylegvdrnpvgaglkvidhlthnvyrgr
maywanfyeklfnfrearyfdikgeytgltskamsapdgmiriplneesskgaqqie
eflmqfngegiqhvafltedlvktwdalkkigmrfmtappdtyyemlegrlpnhgep
vdqlqargilldgssiegdkrlllqifsetlmgpvffefiqrkgddgfgegnfkalf
esierdqvrrgvlttd

配列番号26　アベナ･サティバ(Avena sativa)由来HPPD a/a配列

mpptpatatgaaaaavtpehaarsfprvvrvnprsdrfpvlsfhhvelwcadaasaa
grfsfalgaplaarsdlstgnsahasllrsgalafltapyapppqeaataaatas
ipsfsadaartfaaahglavrsvgvrvadaaeafrvsvaggarpafapadlghgfgl
aevelygdvvlrfvsypdetdlpflpgfervsspgavdygltrfdhvvgnvpemapv
idymkgflgfhefaefteedvgttesglnsvvlannseavllplnepvhgtkrrsqi
qtyleyhggpgvqhialasndvlrtlremrartpmggfefmappqakyyegvrriag
dvlseeqikecqelgvlvdrdddqgvllqiftkpvgdrptfflemiqrigcmekdevg
qeyqkggcggfgkgnfselfksiedyekslevkqsvvaqks

配列番号27　コムギ由来HPPD a/a配列

mpptpttpaatgaaavtpeharprrmvrfnprsdrfhtlafhhvefwcadaasaagr
fafalgaplaarsdlstgnsvhasqllrsgnlaflftapyangcdaataslpsfsad
aarqfsadhglavrsialrvadaaeafrasvdggarpafspvdlgrgfgfaevelyg
dvvlrfvshpdgrdvpflpgfegvsnpdavdygltrfdhvvgnvpelapaaayvagf
tgfhefaefttedvgtaesglnsmvlannsegvllplnepvhgtkrrsqiqtflehh
ggsgvqhiavassdvlrtlremrarsamggfdflppplpkyyegvrriagdvlseaq
ikecqelgvlvdrdddqgvllqiftkpvgdrptlflemiqrigcmekdergeeyqkgg
cggfgkgnfselfksiedyeksleakqsaavqgs

配列番号28　シェワネラ･コルウェリアナ(Shewanella collwelliana)由来HPPD a/a配列

Maseqnplgllgieftefatpdldfmhkvfidfgfsklkkhkqkdivyykqndinfl
lnnekqgfsaqfakthgpaissmgwrvedanfafegavargakpaadevkdlpypai
ygigdsliyfidtfgddnniytsdfealdepiitqekgfievdhltnnvhkgtmeyw
snfykdifgftevryfdikgsqtalisyalrspdgsfcipinegkgddrnqideylk

【表１１】

41

eydgpgvqhlafrsrdivasldamegssiqtldiipeyydtifeklpqvtedrdrik
hhqillvdgdedgyllqiftknlfgpifieiiqrknnlgfgegnfkalfesierdqvr
rgvl

配列番号29　シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)87-79株由来HPPD DNA配列

atggccgaccaatacgaaaacccaatgggcctgatgggctttgaatttattgaattc
gcatcgccgactccgggcaccctggagccgatcttcgagatcatgggcttcaccaaa
gtcgcgacccaccgctccaagaatgtgcacctgtaccgccagggcgagatcaacctg
atcctcaacaaccagcccgacagcctggcctgctacttcgccgccgaacacggccct
tcggtgtgcggcatggcgttccgggtcaaagactcgcagcaggcttacaaccgcgcg
ttggaactgggcgcccagccgattcatatcgaaacccggcccgatggaacctcaacctg
ccggccatcaagggcatcggcggtgcgccgctgtacctgatcgaccgcttcggtgaa
ggcagctcgatatatgacatcgacttcgtgtacctcgaaggtgtcgaccgcaacccg
gtaggcgcgggcctcaaggtcatcgaccacctgacccacaacgtgtatcgcggccgc
atggcctactgggccaacttctacgagaaactgttcaacttccgtgaagcacgctac
ttcgatatcaaggggcgaatacaccggccttacgtccaaggccatgagtgccccggac
ggcatgatccgcatcccgctgaacgaggaatcgtccaagggcgccggccagatcgaa
gagttcctgatgcagttcaacggcgagggcatccagcacgtggcgttcctcaccgaa
gacctggtcaagacctgggatgcgttgaagaagatcggcatgcgcttcatgaccgcg
ccgccggacacctactacgaaatgctcgaaggccgcctgccaaaccacggcgagccg
gtggaccaactgcaggcgcgcggtattttgctggacggctcctcgatcgagggcgac
aagcgcctgctgctgcagatcttctcggaaacccctgatgggcccggtgttcttcgaa
ttcatccagcgcaaagggcgacgatgggtttggcgagggcaacttcaaggcgctgttc
gagtcgatcgagcgcgaccaggtacgtcgcggtgtactgaccaccgac

配列番号30　アベナ・サティバ(Avena sativa)由来HPPD DNA配列

atgccgcccaccccccgccaccgccaccggcgccgccgcggccgccgtgactccagag
cacgcggcccggagctttcccgagtggtccgcgtcaacccgcgcagcgaccgcttc
cccgtgctctccttccaccacgtcgagctctggtgcgccgacgccgcctcagcggcc
ggacgcttctccttcgcgctcggcgcgccgctcgccgccggtccgacctctccacg
gggaactccgcgcacgcctccctcctgctccgctgggcgccctcgccttcctcttc
acggcgccctacgcgccgccgccgcaggaggccgccacggccgcagccaccgcctcc
atccctccttctccgccgacgccgccgcggacgttcgccgccgcccacggcctcgcg
gtgcgctccgtcggggtccgcgtcgctgacgccgccgaggccttccgcgtcagcgta
gccggcggcgctcgccccggcctccgccccagccgacctcggccatggcttcggcctc
gccgaggtcgagctctacggcgacgtcgtgctacgcttcgtcagctaccggacgag
acagacctgccattcctgccagggttcgagcgcgtgagcagccccggcgccgtggac
tacggcctcacgcggttcgaccacgtcgtgggcaacgtcccggagatggccccggtc
atagactacatgaaaggcttcttggggttccacgagttcgccgagttcaccgccgag
gacgtgggcacgaccgagagcgggctcaactcggtggtgctcgccaacaactccgag
gccgtgctgctgccgctcaacgagcccgtgcacggcacaaagcgacggagccagata
cagacgtacctggagtatcacggcgggcccggcgtgcagcacatcgcgctcgccagc
aacgacgtgctcaggacgctcagggagatgcgggcgcgcacgcccatgggcggcttc

【表１２】

gagttcatggcgccaccgcaggcgaaatactatgaaggcgtgcggcgcatcgcaggt
gacgtgctctcggaagagcagatcaaggaatgccaggagctgggggtgctagtcgac
agggatgatcaaggggtgttgctccaaatcttcaccaagccagtaggggacaggcca
acgtttttcctggagatgatccaaagaatcgggtgcatggagaaggacgaggtcggg
caagagtaccagaaggggtggctgcggcgggttggcaaggggcaatttctccgagctg
ttcaagtccattgaggactatgagaaatcccttgaggtcaagcaatctgttgtagct
cagaaatcctag

配列番号31　コムギ由来HPPD DNA配列

atgccgcccaccccccaccaccccgcagccaccggcgccgccgcggtgacgccggag
cacgcgcggccgccgccgaatggtccgcttcaacccgcgcagcgaccgcttccacacg
ctcgcctccaccacgtcgagttctggtgcgcggacgccgcctccgccgccggccgc
ttcgccttcgcgctcggcgcgccgctcgccgccaggtccgacctctccacggggaac
tccgtgcacgcctcccagctgctccgctcgggcaacctgccttcctcttcacggcc
ccctacgccaacggctgcgacgccgccaccgcctccctgccctccttctccgccgac
gccgcgcgccagttctccgcggaccacggcctcgcggtgcgctccatagcgctgcgc
gtcgcggacgctgccgaggccttccgcgccagcgtcgacgggggcgcgcgcccggcc
ttcagccctgtggacctcggccgcggcttcggcttccgcggaggtcgagctctacggc
gacgtcgtgctccgcttcgtcagccaccccggacggcagggacgtgcccttcttgccg
gggttcgagggcgtgagcaaccccagacgccgtggactacggcctgacgcggttcgac
cacgtcgtcggcaacgtcccggagcttgccccgccgcgggcctacgtcgccgggttc
acgggggttccacgagttcgccgagttcacgacggaggacgtgggcacggccgagagc
gggctcaactcgatggtgctcgccaacaactcggagggcgtgctgctgccgctcaac
gagccggtgcacggcaccaagcgccggagccagatacagacgttcctggaacaccac
ggcggctcgggcgtgcagcacatcgcggtggccagcagcgacgtgctcaggacgctc
agggagatgcgtgcgcgctccgccatgggcggcttcgacttcctgccaccccgctg
ccgaagtactacgaaggcgtgcggcgcatcgccggggatgtgctctcggaggcgcag
atcaaggaatgccaggagctggggtgctcgtcgacagggacgaccaagggtgttg
ctacaaatcttcaccaagccagtaggggacaggccgacgttgttcctggagatgatc
cagaggatcgggtgcatggagaaggacgagagaggggaagagtaccagaaggtggc
tgcggcgggttcggcaaaggcaacttctccgagctgttcaagtccattgaagattac
gagaagtcccttgaagccaagcaatctgctgcagttcagggatcatag

配列番号32　シェワネラ・コルウェリアナ(Shewanella colwelliana)由来HPPD DNA配列

gactttatgagtcgcacaggtatcgaagcgggctacatgaccttacatcaaaaaggc
gtgccgcatggaccacaacctggtcgtactgaagcctcagtgggcaaaactgaaacc
tatgagtatgcagtaatggtggacacctttgcaccactgcaactgacccagcatgtc
aatgcgtgcatgagcaaagattacaaccgttcctggctagaagagtaaaagcgttca
gccagtgctgaacatctaataaatataaccacgaggtgacaccgaagagtgccctt
ggttgcaataagttgaaagaggataattacatggcaagcgaacaaaacccactgggt
ctacttggtatcgaattcactgaatttgctacaccagatctagattttatgcataaa
gtttttatcgactttggtttctcaaaacttaaaaaacacaagcagaaagatattgtt
tactataaacaaaatgatattaacttttactcaacaatgaaaaacagggcttttca
gcccagtttgccaaaacgcatggcccagccattagttctatgggctggcgtgtagaa

【表１３】

42

gatgccaactttgcctttgaaggtgctgtagcccgtggggctaaacccgcagcagat
gaggtgaaagatcttccctatcccgctatctatggcattggtgacagccttatctac
tttatcgatacgtttggcgatgacaacaatatctacacttctgattttgaagcgtta
gatgagcctatcatcacccaagagaaaggcttcattgaggtcgaccatctcaccaat
aatgtccataagggcaccatggaatattggtcaaacttctacaaagacatttttggc
tttacagaagtgcgttacttcgacattaagggctcacaaacagctcttatctcttac
gccctgcgctcgccagatggtagtttctgcattccaattaacgaaggcaaaggcgat
gatcgtaaccaaattgatgagtacttaaaagagtacgatggcccaggtgtccaacac
ttagcgttccgtagccgcgacatagttgccctcactggatgccatggaaggaagctcc
attcaaaccttggacataattccagagtattacgacactatctttgaaaagctgcct
caagtcactgaagacagagatcgcatcaagcatcatcaaatcctggtagatggcgat
gaagatggctacttactgcaaatttcaccaaaaatctatttggtccaatttttatc
gaaatcatccagcgtaaaaacaatctcggttttggcgaaggttaattttaaagcccta
tttgaatcgattgagcgtgatcaggtgcgtcgcggcgtactctaacaatcacccagt
gatccaacctcaaaaaaccagcatcgcgctggttttttattgcagcacaacaataa
acctctacactagca

配列番号33　TMV翻訳エンハンサーヌクレオチド配列

tatttttacaacaattaccaacaacaacaaacaacaaacaacattacaattactatt
tacaattacac

配列番号34　TMV及びアラビドプシスのHSTコード配列の融合

tatttttacaacaattaccaacaacaacaaacaacaaacaacattacaattactatt
tacaattacacatatggagctctcgatctcacaatcaccgcgtgttcggttctcgtc
tctggcgcctcgtttcttagcagcttctcatcatcatcgtccttctgtgcatttagc
tgggaagtttataagcctcccacgagatgttcgcttcacgagcttatcaacttcaag
aatgcggtccaaatttgtttcaaccaattatagaaaaatctcaatccgggcatgttc
tcaggttggtgctgctgagtctgatgatccagtgctggatagaattgcccggttcca
aaatgcttgctggagatttcttagaccccatacaatccgcggaacagctttaggatc
cactgccttggtgacaagagctttgatagagaacactcatttgatcaaatggagtct
tgtactaaaggcactttcaggtcttcttgctcttatttgtgggaatggttatatagt
cggcatcaatcagatctacgacattggaatcgacaaagtgaacaaaccatacttgcc
aatagcagcaggagatctatcagtgcagtctgcttggttgttagtgatatttttgc
gatagcagggcttttagttgtcggatttaacttggtccattcattacaagcctata
ctctcttggcctttttctgggaaccatctattctgttccacccctcagaatgaaaag
attcccagttgcagcatttcttattattgccacggtacgaggttttcttcttaactt
tggtgtgtaccatgctacaagagctgctcttggacttccatttcagtggagtgcacc
tgtggcgttcatcacatctttttgtgacactgtttgcactggtcattgctattacaaa
ggaccttcctgatgttgaaggagatcgaaagttccaaatatcaaccctggcaacaaa
acttggagtgagaaacattgcattcctcggttctggacttctgctagtaaattagt
ttcagccatatcactagctttctacatgcctcaggttttagaggtagcttgatgat
tcctgcacatgtgatcttggcttcaggcttaattttccagacatgggtactagaaaa
agcaaactacaccaaggaagctatctcaggatattatcggtttatatggaatctctt
ctacgcagagtatctgttattccccttcctctag

【表１４】

配列番号35　HSTポリペプチドモチーフ1
W(R/K)FLRPHTIRGT
配列番号36　HSTポリペプチドモチーフ2
NG(Y/F)IVGINQI(Y/F)D
配列番号37　HSTポリペプチドモチーフ3
IAITKDLP
配列番号38　HSTポリペプチドモチーフ4
Y(R/Q)(F/W)(I/V)WNLFY

【実施例】

【００７０】

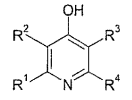
様々な最初の植物形質転換事象（ｅｖｅｎｔ）の除草剤耐性又は抵抗性レベルの平均及び分布を、異なる除草剤の濃度範囲で、植物のダメージ及び分裂組織の白化に基づいて、通常の方法で評価する。これらのデータは、例えば用量／応答性の曲線から得られるＧＲ５０値等の観点から表現され得る。当該用量／応答性の曲線は、ｘ軸に「用量」を表示し、ｙ軸に「死滅パーセンテージ」、「除草効果」、「緑色植物の発芽数」等を表示する。例えば、ＧＲ５０値の増大は、内在的な阻害剤耐性のレベル（例えばＫｉ　ｘ　ｋｃａｔ．／Km_{HPP}値の増大）、並びに／又は発現されるＨＰＰＤ及び／若しくはＨＳＴの発現レベルの増大に対応する。

【００７１】

下記実施例は、表Ａ～Ｆに記載される様々なＨＳＴ阻害除草剤を使用して実施される。

【表１５】

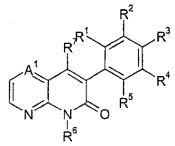
43



化合物	R^1	R^2	R^3	R^4
1.1	F	Cl	Cl	F
1.2	Cl	Cl	Cl	Cl
1.3	F	F	Br	F
1.4	F	Br	Br	F

表A. 化合物1. 1-1. 4.

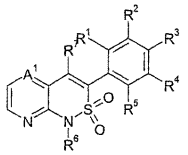
【表１６】



化合物	A^1	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7
2.1	N	F	H	H	Br	Cl	H	OH
2.2	N	$-CH_3$	H	$-CH_3$	H	$-CH_3$	$-CH_3$	OH
2.3	N	F	H	H	F	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.4	N	F	H	H	F	Cl	CH_3	OH
2.5	N	F	H	H	Br	Cl	CH_3	OH
2.6	N	H	H	H	H	$-OCF_3$	H	OH
2.7	N	F	H	H	F	Cl	H	OH
2.8	N	F	H	H	Br	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.9	N	H	CF_3	H	H	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.10	N	$-CH_2CH_3$	H	$-CH_2CH_3$	H	$-CH_2CH_3$	H	OH
2.11	N	$-CH_3$	H	$-CH_3$	H	$-CH_3$	$-CH_2CF_2H$	OH
2.12	N	H	H	H	H	$-OCF_3$	H	OH
2.13	CH	F	H	H	F	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.14	N	Cl	Cl	H	H	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.15	CH	F	H	H	Br	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.16	N	Cl	H	H	H	$-CF_3$	$-CH_3$	OH
2.17	N	F	H	H	F	Cl	$-CH_2CF_3$	OH
2.18	N	F	H	H	F	Cl	$-C\equiv CH$	OH
2.19	N	H	Cl	H	H	CF_3	$-CH_2CF_2H$	OH
2.20	N	Cl	H	H	H	CF_3	$-CH_2CF_2H$	OH
2.21	N	F	H	H	Cl	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.22	CH	Cl	H	H	Br	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
2.23	N	F	H	H	Br	Cl	H	-O(C=O)-*Et*
2.24	N	$-CH_3$	H	$-CH_3$	H	$-CH_3$	$-CH_3$	-O(C=O)-*iPr*
2.25	N	F	H	H	Cl	Cl	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*t*Bu
2.26	CH	F	H	H	F	Cl	CH_3	-O(C=O)-*t*Bu
2.27	N	F	H	H	Br	Cl	CH_3	-O(C=O)-*iPr*
2.28	N	Cl	H	H	H	$-CF_3$	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*iPr*
2.29	N	F	H	H	F	Cl	H	-O(C=O)-*t*Bu
2.30	N	F	H	H	Br	Cl	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*iPr*
2.31	N	Cl	H	H	H	CF_3	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*iPr*
2.32	N	$-CH_2CH_3$	H	$-CH_2CH_3$	H	$-CH_2CH_3$	H	O(C=O)-*iPr*
2.33	N	$-CH_3$	H	$-CH_3$	H	$-CH_3$	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*Et*
2.34	N	H	H	H	H	$-OCF_3$	H	-O(C=O)-*iPr*

表B. 化合物2. 1-2. 34.

【表１７】

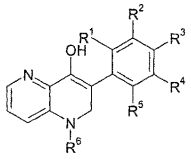


化合物	A^1	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7
3.1	N	CF_3	H	H	H	Cl	$-CH_2CH_3$	OH
3.2	N	H	H	Cl	H	Cl	$-CH_3$	OH
3.3	N	Cl	H	H	H	CF_3	$-CH_2CF_2H$	OH
3.4	N	Cl	H	H	Cl	Cl	$-CH_2CF_2H$	OH
3.5	N	H	H	Br	H	CF_3	$-CH_2CF_2H$	OH
3.6	N	CF_3	H	H	Cl	H	$-CH_2CF_2H$	-O(C=O)-*iPr*

表C. 化合物3. 1-3. 6.

【表１８】

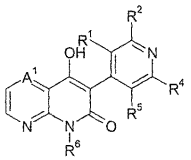
44



化合物	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6
4.1	F	H	H	F	Cl	CH_3

表D. 化合物4. 1

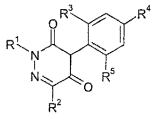
【表１９】



化合物	A^1	R^1	R^2	R^4	R^5	R^6
5.1	N	Cl	H	H	Cl	$-CH_2CF_2H$

表E. 化合物5. 1

【表２０】



化合物	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
6.1	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$

表F. 化合物6. 1

【００７２】

実施例１

昆虫細胞及びE. ｃｏｌｉを用いた植物ＨＳＴ酵素のクローニング及び発現

ｃＤＮＡライブラリーから得られたアラビドプシス（配列番号１１）及びイネ（配列番号１２若しくは配列番号１３）、又は合成した、完全長ＨＳＴコード配列（ＡＴＧ開始コドンを除く）を、ＥｃｏＲＩフランク部位を加えて増幅する。これらの、完全長配列、及び切断コード配列（ＡＲＧ　６４から開始する成熟配列をコードし、アラビドプシスのものは配列番号２１、イネのものは配列番号２２及び２３である）を、両方ともｐＡｃＧ３Ｘベクター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃａｔ．Ｎｏ．　２１４１５Ｐ）中のＥｃｏＲＩ部位に挿入してクローニングし、これらを用いてＳｆ９　（スポンドプテラ・フギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｕｇｉｐｅｒｄａ））昆虫細胞を（下記のように）形質転換して、細胞中で、Ｘａ因子開裂部位を有するＮ末端ＧＳＴ融合タンパク質として、発現させた。同様に、変異した切断成熟（ＡＲＧ　６９）アラビドプシスＨＳＴをコードする、昆虫細胞にコドンを最適化したＤＮＡ配列（配列番号２４）を、ｐＡｃＧ３ＸのＥｃｏＲＩ部位に挿入してクローニングし、これをＳｆ９細胞中でＮ末端ＧＳＴ融合タンパク質として発現させた。アラビドプシスＨＳＴのＳＷＩＳＳＰＲＯＴ受入番号（タンパク質）は、Ｑ

45

１ＡＣＢ３であり、アラビドプシスＨＳＴのＥＭＢＬ受入番号（ＤＮＡ）は、ＤＱ２３１０６０である。

【００７３】

あるいは、アラビドプシス及びクラミドモナスの成熟ＨＳＴコード配列は、ＧＳＴ　Ｎ末端融合タンパク質としてクローニングされ、Ｅ．　ｃｏｌｉ中で発現させられる。

【００７４】

実施例２

細胞の増殖及びＨＳＴ酵素抽出物の調製

ＧＳＴ　Ｎ末端融合タンパク質として成熟アラビドプシス又はクラミドモナスＨＳＴを発現する、Ｅ．　ｃｏｌｉ　ＢＬ２１Ａ１細胞を増殖させ、回収し、破砕し、そしてＨＳＴを発現している膜フラクションが得られる。

【００７５】

例えば、１ｎｇの組換えＤＮＡを使用して、ＢＬ２１ＤＥ３細胞を形質転換することにより、多くの個別のコロニーを取得する。これらのコロニーの１つをピックアップし、最終濃度５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを添加したＬｕｒｉａ　Ｂｒｏｔｈ（ＬＢ）１００ｍｌに播種し、２２０ｒｐｍで振盪しながら、３７℃で一昼夜培養する。翌朝、一昼夜培養した菌液１０ｍｌを用いて、最終濃度５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを添加した新しい滅菌ＬＢ　１Ｌに播種し、これをＯＤが６００ｎｍで０．６になるまで、３７℃、２２０ｒｐｍで振盪培養し、その後０．１ｍｌのＩＰＴＧの添加により誘導をかけ、そして１５℃で一昼夜、誘導し続ける。細胞を、４℃で１０分間、４６００ｒｐｍで遠心分離し、そしてペレットを－８０℃で保存する。例えば、菌液１Ｌから、湿重量約５ｇの細胞ペレットが得られることがわかっている。それから、Ｅ．　ｃｏｌｉ細胞ペレットを、Ｒｏｃｈｅ製ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害剤錠剤（バッファー２００ｍｌに１錠）を添加したｐＨ７．５の５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　２５ｍｌに再懸濁する。１０ｍｌの菌液を氷上でソニケーションにより溶解させる。得られた細胞のライゼートと、３０００ｇで１０分間遠心分離して、細胞核／デブリ等をペレットにする。上澄１０ｍｌを吸引し、これを１５０，０００ｇで６０分間、４℃で遠心分離する。膜を含有するペレットを、２ｍｌの上記バッファー中に再懸濁する。これらの試料を、５０％　ｖ／ｖとなるようにグリセロールを添加して希釈した後、１００μｌずつ分注して－８０℃で保存する。

【００７６】

ｐＡｃＧ３Ｘに由来する、ＨＳＴを発現する移入ベクター（上記）は、独立して、親バキュロウイルスベクターのＦｌａｓｈＢａｃ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と共に、Ｓｆ９懸濁細胞中に、同時に導入される。バキュロウイルスの増幅及びＨＳＴタンパク質発現は、取扱説明書に従い実施される。

46

【００７７】

Ｓｆ９懸濁培養細胞を、５００ｍｌＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒフラスコ中の、１４０ｍｌのＳｆＰ００１１培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃａｔ　Ｎｏ．１０９０２）中で、１．０ＥＸＰ　６細胞／ｍｌの密度で、二次培養する。２７℃で２４時間、１２０ｒｐｍで振盪培養した後、細胞密度を測定し、そして、１４０ｍｌ中に２．０　ＥＸＰ　６細胞／ｍｌとなるように再調整する。既知のタイターの増幅したウイルスストックを調製された懸濁フラスコに添加して、多重度を１０とする。フラスコを密封し、２７℃で７２時間、１２５ｒｐｍで振盪培養し、細胞を溶解せずに、適切にタンパク質を発現させる。フラスコの内容物を均等に５０ｍｌファルコンチューブに分け、そして９０００ｒｐｍで４分間遠心分離することにより、細胞を回収する。３ｍｌの細胞ペレットを残して培地を捨て、これを液体窒素で急速に凍結して、そして－８０℃で維持する。

【００７８】

２５ｍｌのＳｆ９細胞から得たペレット（４日間の発現の誘導後）を、Ｒｏｃｈｅ製ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害剤錠剤（バッファー２００ｍｌに１錠）を添加したｐＨ７．５の５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　１０ｍｌに再懸濁し、それから手動ホモジナイザーを使用してホモジナイズする。得られた細胞ライゼートを、３０００ｇで１０分間遠心分離して、細胞核／デブリ等をペレットにする。上澄１０ｍｌを吸引し、これを１５０，０００ｇで６０分間、４℃で遠心分離する。膜を含有するペレットを、１ｍｌの上記バッファー中に再懸濁する。これらの試料を、５０％　ｖ／ｖとなるようにグリセロールを添加して希釈した後、１００μｌずつ分注して－８０℃で保存する。

【００７９】

発現のモニタリングのためのウエスタンブロットは、ＨＲＰコンジュゲート抗ＧＳＴ抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ワーキング希釈率１：５０００）とのインキュベーション、続いてＥＣＬ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）とのインキュベーションにより行われる。

【００８０】

アッセイ用のＨＳＴ酵素の調製品も、新鮮な植物材料から直接調製される。例えば、ＨＳＴ酵素調製品は、ホウレンソウから得られる。第一の工程において、無傷のホウレンソウの葉緑体を、２ロットの５００ｇの新鮮な若いホウレンソウの葉（例えば地元のスーパーマーケットの生鮮食品売り場にある）から調製する。包装されたホウレンソウは、通常洗ってあるが、葉が汚れているものを買った場合は、加工前に水中ですすがなければならない。柄、大きな葉及び中脈を除去する。各５００ｇのロットの葉を、２Ｌのプラスチックビーカー中の１．５Ｌの「グラインド媒体」中に加える。グラインド媒体は、ｐＨ７．１で、３３０ｍＭのグルコース、２ｍＭのイソ

47

アスコルベート、5mMのＭｇＣｌ２、及び０．１％のウシ血清アルブミンを含有する、低温（４℃）の、トリシン／ＮａＯＨ緩衝液である。前記ビーカーを４℃に維持して、１．５’’カッティングプローブを取り付けたＰｏｌｙｔｒｏｎ　６０００ブレンダーに置き、中の混合物を、全ての葉が浸軟（ｍａｃｅｒａｔｅｄ）するまで、８秒間、８～１０Ｋｒｐｍで、一気に攪拌する。このホモジネートを、５Ｌのビーカー（氷の中に立てた）中で、４層のムスリン及び２層の５０μメッシュナイロン膜を通して濾過する。濾液をＢｅｃｋｍａｎ　ＧＳ－６遠心分離機の２５０ｍｌバスケットに移し、２００ｘｇ（３０２０ｒｐｍ）で２分間、４℃で回転させる。上澄を吸い取ると、葉緑体の堆積物が残る。葉緑体を、数ｍｌの低温の再懸濁媒体中で、穏やかに旋回し、そして再懸濁媒体中に浸されたクイルブラシ（ｑｕｉｌｌ　ｂｒｕｓｈ）を穏やかに使用して、再懸濁する。再懸濁媒体は、３３０mMのソルビトール、２mMのＥＤＴＡ、５mMのKH_2PO_4、２mMのＭｇＣｌ２及び０．１％のウシ血清アルブミンを含有する、ｐＨ７．８の５０mM　Ｈｅｐｅｓ／KOHである。前記葉緑体は、５～１０mLの再懸濁緩衝液中に再懸濁されており、これを再び遠心分離し、更に再び再懸濁して、洗浄を行う。そして、当該葉緑体をもう一度遠心分離で沈殿させ、そしてタンパク質濃度が約４０ｍｇ／ｍｌとなるように、ｐＨ７．８の５０mM　トリシン－ＮａＯＨを約５ｍｌ用いて再懸濁する。この溶液を分注して、－８０℃で凍結保存する。この再懸濁物を解凍し、ＨＳＴ活性アッセイに直接使用する。あるいは、葉緑体は、３３０mMのソルビトールを含有するｐＨ７．８の５０mM　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ緩衝液（代替再懸濁緩衝液）中に再懸濁され、そしてペルコール勾配（４５％ペルコールを含有する上記緩衝液）上に重層されこれをスピンダウンし、無傷の葉緑体を取得する。これを前記代替再懸濁緩衝液中で２～３回洗浄し、再びスピンダウンし、破壊緩衝液（ソルビトール不含）中に再懸濁し、瞬間凍結させ、分注して－８０℃で保存する。

【００８１】

実施例３

ＨＳＴ酵素のアッセイ

プレニルトランスフェラーゼ（ＨＳＴ）活性は、ファルネシル２リン酸（ＦＤＰ）をプレニル供与体として使用する、［U－^{14}Ｃ］ホモゲンチセートのプレニル化の割合を判定することにより測定される。^{14}Ｃホモゲンチセートは、Ｌアミノ酸オキシダーゼ及びＨＰＰＤを使用して、^{14}Ｃチロシンから調製される。

【００８２】

阻害因子の試験において、化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中に溶解する。

２％ｖ／ｖまでであれば、ＤＭＳＯはアッセイに影響しない。対照アッセイは、阻害剤を含有するアッセイの場合と同じＤＭＳＯ濃度で行われる。

48

【００８３】

ホウレンソウの葉緑体（最終体積１００μｌ）を用いたアッセイにおいて、最大２ｍｇの葉緑体タンパク質、５０mMのｐＨ８．５　トリシン／ＮａＯＨ、５０mMのＭｇＣｌ$_2$、２００μMのファルネシル２リン酸（ＦＤＰ）及び２６μMの^{14}Ｃ－ホモゲンチセート（１６７ｄｐｍ／ｐｍｏｌ）が含まれる。アッセイは、２８℃で約１時間実行される。阻害因子の実験において、最終濃度５００ｐｐｍのハロキシジンは、前記反応を完全に阻害することが見出される。あるいは、０秒で反応を停止して溶媒抽出を行ったものも、ベースライン参照となる。親油性反応産物は、本質的には本文中に記載されるように、抽出及び解析される。

【００８４】

Ｅ．　ｃｏｌｉの細胞膜中に発現している前記組換えクラミドモナスＨＳＴは、５０mMのｐＨ８．５　トリシン／ＮａＯＨ、２０mMのＭｇＣｌ$_2$中の２００μMのＦＤＰ及び１００μMのホモゲンチセート（４０ｄｐｍ／ｐｍｏｌ）を含む、標準的な反応混合物中でアッセイされる。アッセイは、酵素の添加により開始され、２８℃で最長２０分間実行される。

【００８５】

組換えアラビドプシス及びイネＨＳＴを、昆虫細胞中で発現させる。アッセイは、温度を２７℃とする以外は、クラミドモナスＨＳＴと同様に行われる。アッセイは、３００μｌの溶媒混合物（クロロホルム：メタノール、１：２）及び１００μｌの０．５％ＮａＣｌで停止され、振盪／混合され、そして、ベンチトップエッペンドルフ遠心分離機中で、５分間回転させられる。８０μｌの下層の抽出物をＴＬＣプレート（ｓｉｌｉｃａ　Ｇｅｌ　６０、２０ｃｍ　ｘ　２０ｃｍ）ＦＬＡ３０００システムにロードし、ジクロロメタン中で３５分間展開する。Ｆｕｊｉ　Ｐｈｏｓｐｈｏｉｍａｇｅｒを使用して放射能を定量し、そして産物の量の定量的尺度として、バンド強度を組み入れる。酸化及び還元された２－メチル－６－ファルネシル－１，４－ベンゾキノール（ＭＦＢＱ）に対応するバンドが同定され、それら２つのバンド強度の合計を計算して、ＭＦＢＱ産物形成の全体量を推定する。例えば、８ｐｍｏｌのＭＦＢＱ　min^{-1}　mg^{-1}　タンパク質（２３ｐｍｏｌ）及び７ｐｍｏｌのＭＦＢＱ　min^{-1}　mg^{-1}　タンパク質（１４ｐｍｏｌ）の特異的活性は、それぞれ、トランスフェクションの４日後及び５日後の昆虫細胞の細胞膜中に発現しているＧＳＴ融合切断アラビドプシスＨＳＴ（配列番号３）を推定する。同様の結果が、Ｅ．　ｃｏｌｉに発現させたアラビドプシスＨＳＴの過去の論文に述べられている。昆虫細胞に発現させたＧＳＴ融合切断イネＨＳＴ（配列番号４）の活性も、同様である。ＧＳＴ融合タンパク質としての、非切断ＨＳＴコード配列の発現も、ＨＳＴ活

性を有する。昆虫細胞に最適化されたＧＳＴ融合切断アラビドプシスＨＳＴ（配列番号２３）の発現は、特異的活性において、非最適化遺伝子の約３～１０倍の増大を示す。

【００８６】

上記アッセイを使用して、一定の範囲の阻害因子の存在下で形成されるＭＦＢＱの量の、阻害因子非存在下で対照における量に対する阻害パーセンテージが報告される（表１）。良好な阻害因子は、低用量で優れた阻害パーセンテージをもたらす。

【００８７】

上記反応条件下でアッセイされる全てのＨＳＴ酵素調製物において、ＭＦＢＱの形成は、^{14}Ｃホモゲンチセート（ＨＧＡ）からＨＳＴにより触媒される唯一の反応ではないことが見出されている。実際に、^{14}Ｃ　ＨＧＡからの主要な（～９０％）放射性ラベル産物は、ＭＦＢＱではない。これらの意図しない他の産物は、クロロホルム／メタノール中に同様に抽出されるが、ジクロロメタンＴＬＣにおいて、ベースラインに、又はベースライン付近に留まることが見出される。４つの明らかな^{14}Ｃラベルされたバンド（２組のキノン／キノールのペアに対応すると予想される）は、ジクロロメタン：ヘキサン：アセトニトリル：蟻酸が１２：３：５：０．５の溶媒を用いた２次元目のＴＬＣにおいて、部分的に分解される。そのようなバンドは、ＦＰＰの非存在下（又はＦＰＰがピロリン酸塩に代えられているとき）で認められないことから、これらのバンドは、ファルネシル化と脱カルボキシル化が緊密に関連していないことにより形成されると仮定される。即ち、脱カルボキシル化を伴わないファルネシル化によりカルボキシル化ＭＦＢＱが生じ、ファルネシル化を伴わない脱カルボキシル化により、メチルキノール／キノンが生じる。それらの正体が何であれ、ＭＦＢＱより極性のこれらの産物は、全て真正の酵素反応の産物であることは明白である。なぜなら、ＦＤＰの非存在下で、又は非遺伝子組換え（ＨＳＴ非発現の）細胞膜を使用した場合、それらは形成されないからである。加えて、ハロキシジン等の阻害因子が、用量に応じて、前記他の産物の形成を阻害し、その阻害がＭＦＢＱの形成の阻害に明らかに共線状（ｃｏ－ｌｉｎｅａｒ）であることが見出されている。故に、ＨＳＴ酵素反応をほぼ完全に阻害する５００ｐｐｍのハロキシジンの存在下では、ＭＦＢＱ及び前記他の産物のいずれも形成されない。

【００８８】

故に、改良された、より高感度及び簡便な形式の上記アッセイにおいて、ＴＬＣ工程は、１００％阻害の「対照」として５００ｐｐｍのハロキシジン（又は適切な濃度の他の阻害因子）による処理が使用され、そしてクロロホルム／メタノール抽出物の一部が直接シンチレーションバイアルに取られ、定量されることにより行われる。

【００８９】

これらのアッセイは、通常、１００μＭの^{14}Ｃ　ＨＧＡ、２５℃、２０分未満（即ち対照アッセイの速度が線形である期間にわたり）で、そしてＨｉｌｌの式に適合する曲線（傾き、ｎの変更が可能）からＩＣ５０が得られるように使用される試験阻害因子の濃度範囲で行われる。

【００９０】

結果

【表２１】

化合物	10 ppmにおけるクラミドモナスHST阻害％	25 ppmにおけるクラミドモナスHST阻害％	100 ppmにおけるクラミドモナスHST阻害％	25 ppmにおけるホウレンソウ葉緑体抽出物阻害％
アミトロール	0	-	0	-
クロルスルフウロン	-	0	-	0
1.1	70	80	95	70
1.2	-	70	-	80
1.3	-	55	-	65
1.4	-	65	-	75

【表２２】

2.1	10	-	40	-
2.2	70	-	95	-
2.3	40	-	85	-
2.4	5	-	45	-
2.5	70	-	90	-
2.6	5	-	20	-
2.7	5	-	20	-
2.8	-	85	-	70
2.9	-	90	-	90
2.10	-	50	-	0
2.11	-	80	-	30
2.12	-	0	-	0
2.13	-	60	-	40
2.14	-	85	-	80
3.1	-	20	-	20

【表２３】

51

3.2	-	0	-	15
3.3	-	20	-	35
3.4	-	50	-	40
4.1	0	-	0	-
5.1	-	20	-	10

表１
様々な原料（表示される）に由来するＨＳＴを使用して行われた、様々な濃度の様々な化合物における、（対照に対する）ＨＳＴ反応の阻害パーセンテージの計測結果を示す。
アッセイはＴＬＣに基づき、ＭＦＢＱの生成量が推定された。
【表２４】

化合物	推定IC50 (ppm)	95%信頼限界
2.3	19'	
2.4	211'	
2.5	48'	
2.8	12	10.5-14
2.9	6	4.5-8
2.11	31'	
2.13	54'	
2.14	9	8-9.5

【表２５】

2.15	12	9.6-14
2.16	78	51-118
2.17	38	21-68
2.18	6	4.3-7.5
2.19	6	4.5-8
2.20	16	11-25
2.21	64	52-78
3.5	42	28-62
6.1	63	39-102

表２
全抽出（ＴＬＣではなく）アッセイに基づく、アラビドプシスＨＳＴの阻害のＩＣ５０の推定値を示す。これらの推定値は、ＨＰＰ濃度５０μＭのみで実施された３点の用量曲線から得られた。
【００９１】
実施例４

52

ヘテロ接合ＨＳＴ酵素を発現するステーブル遺伝子組換え植物株の調製
例えば、配列番号１１のアラビドプシスＨＳＴを、二重の３５ｓ　ＣＭＶプロモーター配列及びＴＭＶ翻訳エンハンサー配列の下流かつｎｏｓ遺伝子由来の３’ターミネーターの上流にクローニングする。この発現カセットをｐＭＪＢ１（ＷＯ９８／２０１４４に記載）中にライゲーションし、そしてｐＢＩＮ１９内にライゲーションし、そして、植物形質転換に先立ち、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）株ＬＢＡ４４０４を形質転換する。
【００９２】
例えば、配列番号１１の完全長アラビドプシスＨＳＴを、オーバーラップＰＣＲにより、ＴＭＶ翻訳エンハンサー配列（配列番号３３）と融合させ、そして同時に、ＰＣＲにより、５’ＸｈｏＩ部位及び３’ＬｐｎＩ部位を追加する。部位特異的突然変異により、内在的ＸｈｏＩが除去される。ＴＭＶ／ＨＰＰＤ融合体を、ＸｈｏＩ／ＫｐｎＩを用いた消化によりｐＢＩＮ１９から取り出し、ＴＭＶ／ＨＳＴ融合体（配列番号３４）と入れ替える。こうして、ＴＭＶ／ＨＳＴ融合体は、二重の３５ｓプロモーターの下流かつｎｏｓ遺伝子由来の３’ターミネーターの上流にクローニングされる。前記改変されたｐＢＩＮ１９ベクター（「ｐＢｉｎＡＴ　ＨＳＴ」）を再びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）株ＬＢＡ４４０４に形質転換する。
【００９３】
同様に、植物の形質転換用のベクターは、任意のＨＳＴ及び配列番号１２～２０等のＤＮＡ配列を含むように構築される。
【００９４】
あるいは、ベクターは、光合成原核生物、高等及び下等植物由来のＨＳＴをコードするＤＮＡを含み、それらの配列は、当業者に公知の方法を使用して、ｃＤＮＡライブラリーから得られる。例えば、５～２０日齢の植物の苗から、Ｔｒｉ－Ｚｏｌ抽出（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、トータルＲＮＡが調製される。例えば、アベナ・サティバ（Ａｖｅｎａ　ｓａｔｉｖａ）から、Ｏｌｉｇｏｔｅｘ　ｍＲＮＡ精製システム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、ｍＲＮＡが調製される。例えば、Ａ．サティバＨＳＴ遺伝子の５’末端は、内在的ＨＳＴ遺伝子に特異的なプライマー（ＨＳＴコンセンサス領域、例えば配列番号３５、３６、３７及び３８等に基づく）と共にＧｅｎｅ　Ｒａｃｅｒ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して実施される、５’ＲＡＣＥを使用して同定される。遺伝子の３’末端は、適切なオリゴｄＴプライマー及び適切な内在的ＨＳＴ遺伝子プライマーと共にＴｈｅｍｏｓｃｒｉｐｔ　ＲＴ（Ｌｉｆｅ

53

Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用しての３’ＲＡＣＥ、及びその後のＰＣＲにより同定される。全ての方法は、様々な製造業者が提供するプロトコルに従い行われる。５’及び３’ＲＡＣＥ反応で得られる産物は、ｐＣＲ２．１　ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にクローニングされ、クローニング産物は、ユニバーサルＭ１３フォワード及びリバースプライマーを使用して、自動ＡＢＩ３７７　ＤＮＡシークエンサーでシークエンシングされる。そして、プライマーがそれぞれＨＳＴ遺伝子の翻訳開始及び終結コドンに合わせて設計される。両プライマーは、完全長コード配列を取得するために、Ｏｎｅ－ｓｔｅｐ　ＲＴＰＣＲ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ又はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に使用される。取得される産物は、ｐＣＲ　２．１　ＴＯＰＯ中にクローニングされ、シークエンシングされ、そして当業者に公知の配列（例えば本明細書中のＨＳＴ配列）と比較することにより、ＨＳＴとして同定される。

【００９５】

マスタープレートのバイナリーベクターｐＢｉｎＡＴＨＳＴ（上記）又は異なるＨＳＴを含む類似のバイナリーベクターを保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の単一細菌コロニーを、１００ｍｇ／ｌのリファンピシン及び５０ｍｇ／ｌのカナマイシンを含有する１０ｍｌのＬＢに播種する。これを、２００ｒｐｍで攪拌しながら、２８℃で一昼夜インキュベーションする。この菌液を、５０ｍｌの体積のＬＡ（抗生物質添加）に播種する。これを再び、２００ｒｐｍで攪拌しながら、２８℃で一昼夜インキュベーションする。アグロバクテリウム細胞を、３０００ｒｐｍで１５分間遠心分離することによりペレット化し、そして３０ｇ／ｌのスクロースを含む、ｐＨ５．９のＭＳ培地中に懸濁し、ＯＤ（６００ｎｍ）＝０．６にする。この懸濁物を、ペトリ皿に２５ｍｌずつ分注する。

【００９６】

クローナル微小育苗タバコシュート栽培物（ｓｈｏｏｔ　ｃｕｌｔｕｒｅ）から、若い（まだ完全に展開していない）葉を切り出す。中脈及び葉の外側のマージンを取り除き、残ったラミナを、１ｃｍ角にカットする。これらを、アグロバクテリアの懸濁液に移し、２０分間置く。そして、外植片を取り出し、滅菌濾紙の上に置いて余分な懸濁液を取り除き、これを、ＮＢＭ培地（８ｇ／ｌのプラントアガーで固形化した、ＭＳ培地、３０ｇ／ｌのスクロース、1ｍｇ／ｌのＢＡＰ、０．1ｍｇ／ｌのＮＡＡ、ｐＨ　５．９）に、背軸面が培地と接触するように置く。プレートあたり約７個の外植片を置き、それらを密封し、照明付きのインキュベーター中、明期１６時間で３日間維持する。

【００９７】

そして、外植片を、１００ｍｇ／ｌのカナマイシン及び

54

アグロバクテリアの更なる増殖を防ぐ抗生物質（２００ｍｇ／ｌのチメンチン及び２５０ｍｇ／ｌカルベニシリン）を含む、ＮＢＭ培地に移す。同一の培地上での更なるサブカルチャーを、２週間ごとに行う。

【００９８】

シュートの外植片からカルスが形成され始めたら、これらをシュート伸長培地（ＭＳ培地、３０ｇ／ｌのスクロース、８ｇ／ｌのプラントアガー、１００ｍｇ／ｌのカナマイシン、２００ｍｇ／ｌのチメンチン、２５０ｍｇ／ｌのカルベニシリン、ｐＨ５．９）に取る。ステーブル遺伝子組換え植物は、２週間以内に発根を開始する。最終的に遺伝子組換え植物あたり２つ以上の除草剤試験が可能となるように事象あたり複数の植物を生産するため、全ての発根シュートを育苗して、３つ以上の発根クローンを生じさせる。

【００９９】

カナマイシンを含有する培地上で、発根し、活発なシュートの成長を示す、推定遺伝子組換え植物は、前記アラビドプシスＨＳＴトランス遺伝子内の５００ｂｐを増幅したプライマーを使用してのＰＣＲにより解析される。形質転換されていないタバコにおける同一のプライマーセットを使用しての評価により、これらのプライマーが本来のタバコＨＳＴ遺伝子の配列を増幅し得ないことが、決定的に示されている。

【０１００】

外来ＨＳＴ発現の相対レベルを大まかに評価するため、独立したＰＣＲで陽性のタバコシュートの若葉を採取し、１ｃｍ角に切り、そして1ｍｇ／ｌのハロキシジンを含むＮＢＭ培地上に置く。これらの葉の外植片はカルスを形成し、最終的にシュートを再生する。

これらのＨＳＴを過剰発現する外植片は、緑色のカルス及びシュートを再生した。形質転換しなかった外植片又はＨＳＴ発現が限定的な形質転換体の外植片は、脱色したカルス、及び萎縮し、脱色したシュートを形成し、最終的には死滅した。

【０１０１】

ＰＣＲ陽性の事象は、ハロキシジンの存在下での、緑色のシュートを生ずるカルスの増殖に対応し（スコア＞＝３）、それらの多くのものが、非形質転換対照材料よりも良好な、一定レベルの耐性を呈することが見出される。

【０１０２】

発根した遺伝子組換えＴ０小植物（ｐｌａｎｔｌｅｔ）を寒天から取り、５０％ピート、５０％Ｊｏｈｎ　Ｉｎｎｅｓ　ｓｏｉｌ　ｎｏ　３、又は例えばＭｅｔｒｏｍｉｘ（登録商標）３８０ｓｏｉｌ　（Ｓｕｎ　Ｇｒｏ　Ｈｏｒｔｉｃｕｌｔｕｒｅ，　Ｂｅｌｌｅｖｕｅ，　ＷＡ）等に徐放性肥料を混ぜたものを入れた３インチの円形、又は４インチの角型ポットに植え、温室中で８～１２日間、通常の給水条件で維持する。温室の条件は、日

55

中約２４～２７℃；夜間１８～２１℃で、明期は約１４時間である（英国の夏季）。湿度は～６５％で、光度は、ベンチレベルで最大２０００μｍｏｌ／m^2 である。新しい組織が発生して、植物が２～４枚の葉を有する段階となったら、各事象のクローンの幾つかに、０．２～０．２５％のＸ－７７界面活性剤及び水に溶解した試験化合物を噴霧する。

噴霧は、植物の頂点から約２インチの高さにノズルを備えたＤｅＶｒｉｅｓスプレーチャンバー中で、２ｍｐｈで移動する適切なトラックスプレーヤーを用いて行う。噴霧体積は、適切には１エーカーあたり２５ガロンであり、例えば２０００ｌ／ｈａである。

【０１０３】

試験化合物は、例えば、化合物２．３では５００ｇ／ｈａで施用される。遺伝子改変植物が噴霧を受けるのと同時に、種子から成長させたｗ／ｔサムスンタバコ（Ｓａｍｓｕｎｔｏｂａｃｃｏ）植物、並びに組織培養から再生した非遺伝子改変植物及び組織培養を行わなかった非遺伝子改変植物にも噴霧をした。ダメージは、同様のサイズ及び発生段階の非噴霧対照植物との比較により評価する。

【０１０４】

【表２６】

	化合物3		化合物3
事象	500g/ha	事象	500g/ha
A1	0	E5	1
A12	1.5	E6	2.5
A4	0	E8	0
A6	0	F12	4
A9	0.5	F2	4
B1	2	F3	1
B3	2.5	F4	1
B8	5	F5	2
C11	2.5	F7	0
C12	0	G1	4
C4	2	G4	0
C8	5	G5	1
C9	0	G9	9
D2	10	H8	8
D4	2	W/T_SD	0
D5	0	W/T_SD	0
D6	2.5	W/T_SD	0
D8	3	W/T_TC	0
E1	2	W/T_TC	0
E10	0	W/T_TC	0

表３

化合物２．３（表中で化合物３と表記される）処理１１日後の、アラビドプシスＨＳＴ遺伝子改変タバコ植物の評価を示す。非処理対照と比較して、全ての植物が、５００ｇ／ｈａの処理で影響を受け、矮小化し、そして成長が遅れる。しかしながら、分裂組織が白色化し、本質的に死滅する対照と異なり、多くのＨＳＴ遺伝子組換え植物は、分裂組織が緑色で、復活し、そして一部のものは、本質的に脱色していない。植物は、０～１０のスケールで評点され、０は、本質的に脱色し／焼け、及び分裂組織が死滅／白色化した状態を意味し、そして１０は、植物全体が緑色でダメージを受けていないように見えるものを意味する。

【０１０５】

56

上記実験に加えて、Ｅ９及びＦ６の２つのアラビドプシスＨＳＴ発現遺伝子組換え植物株を、成長段階が僅かに進んでいる（４～５葉）点を除いて上記方法と同様に、２５０ｇ／ｈａのハロキシジンで処理した。処理の８日後、ｗ／ｔ植物は、５５～６５％のダメージを受け、Ｆ６系は５０～７５％のダメージを受け、一方、Ｅ９系は僅か２０～４０％のダメージしか受けていなかった。

【０１０６】

処理の２５日後、前記ｗ／ｔ及びＦ６植物は発育が阻害され、脱色し、及び矮化したままであった（５０～７０％ダメージ）が、一方、Ｅ９植物は、良好な健康状態で、サイズも非処理コントロール植物に近かった。よって、アラビドプシスＨＴＳの発現は、ハロキシジンに対する抵抗性を付与する。

【０１０７】

前記植物は、処理後２８日が最長の、様々な処理後時間において、評価される。ＨＳＴ除草剤からのダメージが最も少ない事象（Ｃ８、Ｇ９、Ｅ９）において、植物を、開花させ、袋をかぶせ（ｂａｇｇｅｄ）、そして自家受粉させる。選択された事象で生じた種子を採取し、再びポットに播種し、そして除草剤抵抗性の噴霧試験において、除草剤抵抗性を再び試験する。Ｔ１植物株の中で、単一コピーの事象は、分離比が３：１であることにより（例えば、コンストラクトに依存して、カナマイシン選択及びｗｒｔ除草剤耐性形質の両方を有することにより）、及び定量的ＲＴ－ＰＣＲにより、同定される。

【０１０８】

実施例５

アラビドプシスＨＳＴ、アベナＨＰＰＤ又はシュードモナスＨＰＰＤを発現するように形質転換したＴ１及びＴ２遺伝子組換え植物の生産及び更なる試験

上記実施例のＴ０遺伝子組換えタバコ植物株Ｂ８及びＧ９を、自家受粉させる。各株の自家受粉により得られた種子の約５０個を、３インチのポットに入れた土／ピート混合物に植え、温室中で７～１０日育て、そして、５００ｇ／ｈａの化合物２．３を噴霧する（全て前記実施例と同じ）。各株において、約３／４の植物が前記除草剤に対して有意な抵抗性を示し、そしてそれらの幾つかの植物（恐らく単一挿入事象のホモ接合体）は、最高の抵抗性を見せる。より高度に耐性のＴ１植物の幾つかを再び自家受粉して、Ｔ２植物のバッチを生産する。

【０１０９】

６個のｗ／ｔサムスンタバコの種子、並びに８つの事象Ｂ８及びＧ９の種子を３インチのポットに植え、７～１２日間育て、そして、上記実施例のように、それらの小植物を、様々な化合物に対する抵抗性を試験するために噴霧試験に付し、そして処理の１４日後に評価を行う。化合物は、０．７％のＸ７７中で製剤化され、２００１／ｈａの噴霧体積で噴霧される。結果は、下記表４に描写されている。この結果は、除草剤耐性形質の遺伝性を

57

明確に実証する。また、この結果は、また、これらの結果は、明らかな非遺伝子組換え分離個体は除いて、遺伝子組換えアラビドプシスＨＳＴタバコＴ１植物は、化合物２．１５及び２．３０を用いて試験した場合にＨＳＴ除草剤に対して抵抗性を有するが、その形質は特異的であり、それらの植物は、ノルフルラゾン及びアトラジン等の、試験された他の２つの除草剤に対して顕著な耐性を有していないことを示す。

【０１１０】

【表２７】

株	Rep	化合物 2.15 1kg/ha	化合物 2.30 150g/ha	ノルフルラゾン 150g/ha	アトラジン 500g/ha
B8	1	5	60	35	100
	2	10	0	15	100
	3	15	0	15	100
	4	0	0	15	100
	5	0	0	15	100
	6	0	0	10	100
	7	0	0	15	100
	8	0	60	35	100
G9-2	1	0	0	15	100
	2	0	65	20	100
	3	0	65	15	100
	4	0	0	15	100
	5	0	0	15	100
	6	0	0	20	100
	7	40	0	35	100
	8	0	0	40	100
WT 対照	1	30	60	20	100
	2	30	60	15	100
	3	20	70	10	100
	4	50	75	15	100
	5	50	75	15	100
	6	50	70	15	100

表４

様々な除草剤による処理後１４日での、アラビドプシスＨＳＴ株Ｂ８及びＧ９のＴ１稔性植物に対する、除草剤のダメージ%の評価を示す。

【０１１１】

二重強化３５Ｓ　ＣＭＶプロモーター領域、Ｎｏｓ３’ターミネーター及びＴＭＶ翻訳エンハンサーの操作可能な支配化にある、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）株８７－７９の野生型ＨＰＰＤ遺伝子を発現するタバコ植物は、ＷＯ０２４６３８７の実施例４に詳述されているようにして、生産された。メソトリオンに対する耐性を呈するＴ０事象を自家受粉して、単一挿入Ｔ１株（除草剤耐性及びカナマイシン選択の形質の分離比が３：１である）を生産し、これを再び更に自家受粉して、Ｃ２と表記されるＴ２株が得られる。

【０１１２】

野生型タバコ植物の種子、Ｃ２タバコ植物及び更なるアラビドプシスＨＳＴ発現タバコ株のＴ１子であるＤ２の種子を、３インチのポットに植え、それらを育て、表５に示す割合で、化合物１．１、２．３０及び３．６を噴霧した。処理後７日での、ダメージパーセントの評点を評価した。推定非遺伝子組換え分離個体を除いて、アラビドプシスＨＳＴ発現コンストラクトを保有するＤ２株は、前記２つのＨＳＴに対して最高度の耐性を示したが

58

、シュードモナスＨＰＰＤを保有するＣ２株は、この試験の条件下での最低限の耐性しか生じない。

【０１１３】

【表２８】

化合物	割合 gai/ha	WT	WT	WT	C2	C2	C2	C2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2
1.1	25	75	75	75	75	75	75	75	30	55	35	65	65	100	65	55
2.30	150	75	80	85	90	70	80	80	40	65	40	50	55	60	60	90
	300	75	70	80	85	85	85	85	90	60	80	60	95	98	70	90
	450	70	70	75	65	70	85	85	70	35	20	35	55	55	60	65
3.6	150	80	80	80	60	60	60	60	70	10	70	10	30	20	65	25
	300	80	80	75	65	65	65	70	40	65	35	7	85	80	85	75
	450	85	85	85	65	65	65	65	25	55	25	65	70	65	80	75

表５

様々なＨＳＴ阻害因子に対する、野生型（ＷＴ）サムスン、Ｃ１及びＤ２タバコラインの試験を示す。結果は、処理の７日後でのダメージ%で描写する。

【０１１４】

【表２９】

株	ダメージ % 処理5日後	処理10日後
367	25	10
332	30	10
404	45	20
426	45	20
351	50	25
wt	55	25
wt	55	60
wt	55	60
wt	50	35
wt	60	60
wt	60	30

表６

メソトリオンで処理したアラビドプシスＨＳＴタバコのＴ０株の試験を示す。アラビドプシスＨＳＴで形質転換したタバコの５つの株は、１０ｇ／ｈａのメソトリオンで処理して１０日で、同様に処理した野生型株よりも、ダメージが少なかった。アラビドプシスＨＳＴの発現は、ＨＰＰＤ除草剤、メソトリオンに対する、ある程度の耐性を付与する。

【０１１５】

実施例６

ＨＳＴ除草剤に対する、アベナＨＰＰＤを発現する植物の抵抗性

二重強化３５Ｓ　ＣＭＶプロモーター領域、Ｎｏｓ３’ターミネーター及びＴＭＶ翻訳エンハンサーの操作可能な支配化にある、アベナ・サティバ（Ａｖｅｎａ　ｓａｔｉｖａ）の野生型ＨＰＰＤ遺伝子を発現するタバコの稔性Ｔ１株は、ＷＯ０２４６３８７に詳述されているようにして、生産された。メソトリオン耐性Ｔ０事象の自家受粉に由来するＴ１種子約３０～４０個を、７～１０日齢まで育て、上記のように噴霧及び評価を行い、そしてそれらの結果（処理後６日）を、下記表７に描写する。本実験の条件下では、アベナＨＰＰＤは、ＨＳＴ阻害因子２．３０及び３．６の両方に対して、ある程度の耐性が認められる。

59

【０１１６】
【表３０】

株	Rep.	メソトリオン 100g/ha	化合物2.30 150g/ha	化合物3.6 300g/ha
WT	1	70	70	65
	2	80	70	65
	3	80	70	65
アベナ HPPD	1	5	55	10
	2	10	55	10
	3	20	55	5
	4	0	55	5
	5	0	55	3
	6	0	55	10
	7	0	40	10
	8	5	50	15
	9	10	45	5
	10	5	40	10
	11	2	45	10
	12	5	50	10
	13	0	50	5
	14	0	60	5
	15	8	30	15
	16	5	40	15
	17	3	60	5
	18	15	60	10
	19	3	60	5
	20	0	70	5
	21	15	65	5
	22	10	70	10
	23	5	55	8
	24	0	55	5
	25	5	55	5
	26	0	45	10
	27	80	55	15
	28	5	55	10
	29	3	45	5
	30	3	60	10

表７
メソトリオン、化合物２．３０及び化合物３．６に対する、野生型（ＷＴ）サムスンタバコ及びアベナＨＰＰＤ発現タバコ株の試験を示す。結果は、処理の６日後のダメージパーセントを描写する。
【０１１７】
実施例７
タバコの形質転換、及びＨＳＴ除草剤に耐性のＨＳＴ発現形質転換体の選択
マスタープレートから前記バイナリーベクターｐＢｉｎＡＴ　ＨＳＴ（実施例６に記載）を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の単一細菌コロニーを、１００ｍｇ／ｌのリファンピシン及び５０ｍｇ／ｌのカナマイシンを含有する１０ｍｌのＬＢに播種する。これを、２００ｒｐｍで攪拌しながら、２８℃で一昼夜インキュベーションする。
【０１１８】
この菌液を、５０ｍｌの体積のＬＡ（抗生物質添加）に播種する。これを再び、２００ｒｐｍで攪拌しながら、２８℃で一昼夜インキュベーションする。アグロバクテリウム細胞を、３０００ｒｐｍで１５分間遠心分離することによりペレット化し、そして３０ｇ／ｌのスクロースを含む、ｐＨ５．９のＭＳ培地中に懸濁し、ＯＤ（６００ｎｍ）＝０．６にする。この懸濁物を、ペトリ皿に２５ｍｌずつ分注する。
【０１１９】
クローナル微小育苗タバコシュート栽培物から、若い（

60

まだ完全に展開していない）葉を切り出す。中脈及び葉の外側のマージンを取り除き、残ったラミナを、１ｃｍ角にカットする。これらを、アグロバクテリアの懸濁液に移し、２０分間置く。そして、外植片を取り出し、滅菌濾紙の上に置いて余分な懸濁液を取り除き、これを、ＮＢＭ培地（８ｇ／ｌのプラントアガーで固形化した、ＭＳ培地、３０ｇ／ｌのスクロース、１ｍｇ／ｌのＢＡＰ、０．１ｍｇ／ｌのＮＡＡ、ｐＨ　５．９）に、背軸面が培地と接触するように置く。プレートあたり約７個の外植片を置き、それらを密封し、照明付きのインキュベーター中、明期１６時間で３日間維持する。
【０１２０】
そして、外植片を、０．５ｍｇ／ｌのハロキシジン及びアグロバクテリアの更なる増殖を防ぐ抗生物質（２００ｍｇ／ｌのチメンチン及び２５０ｍｇ／ｌカルベニシリン）を含む、ＮＢＭ培地に移す。同一の培地上での更なるサブカルチャーを、２週間ごとに行う。
【０１２１】
シュートの外植片からカルスが形成され始めたら、これらをシュート伸長培地（ＭＳ培地、３０ｇ／ｌのスクロース、８ｇ／ｌのプラントアガー、１ｍｇ／ｌのハロキシジン（若しくは適切に選別がなされる濃度の類似の物質若しくは他の任意のＨＳＴ除草剤）、２００ｍｇ／ｌのチメンチン、２５０ｍｇ／ｌのカルベニシリン、ｐＨ５．９）に取る。発根して持続的に増殖するシュートは、ＨＳＴトランス遺伝子のステーブル導入を解析するために、ＰＣＲに付される。最終的にこれらのシュートは土に移され、温室条件下で育成される。Ｔ１種子は、選択されたＴ０株から生産される。
【０１２２】
故に、ＨＳＴ阻害除草剤と組み合わせてのＨＳＴ遺伝子の使用は、遺伝子組換え植物組織の選択の手段を提供することが見出される。
【０１２３】
実施例８
ヘテロ接合ＨＰＰＤ酵素を発現するステーブル遺伝子組換え植物株の育苗及び試験
タバコ、ダイズ及びトウモロコシの遺伝子組換え株は、例えばアベナ（配列番号２６）、コムギ（配列番号２７）、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ）（配列番号２５）及び、ＷＯ　０２／４６３８７等に記載されるシェワネラ・コルウェリアナ（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｃｏｌｗｅｌｌｉａｎａ）（配列番号２８）等に由来する、様々なヘテロ接合ＨＰＰＤを発現するように改変されていてもよい。
【０１２４】
選択された事象の種子を回収し、ポットに播種し、そしてＨＰＰＤ除草剤（例えばメソトリオン）に対する抵抗性の噴霧試験において、除草剤耐性を再び試験する。Ｔ

61

１植物株の中で、単一コピーの事象は、分離比が３：１であることにより（例えば、ｗｒｔ、カナマイシン及び／又は除草剤）、及び定量的ＲＴ－ＰＣＲにより、同定される。そのようにして選択されたＴ１タバコ（サムスン種）株の種子は、５０％ピート、５０％Ｊｏｈｎ Ｉｎｎｅｓ ｓｏｉｌ ｎｏ ３を入れた３インチの円形ポットに播種される。３枚葉の段階まで成長させた後、植物に上記の如く噴霧して、同様に処理した非遺伝子組換えタバコ植物と比較しての、除草剤耐性を試験する。

【０１２５】

対照タバコ植物、及びシュードモナス又はコムギのいずれかのＨＰＰＤ遺伝子を発現する遺伝子組換えＴ１植物に、３７、１１１、３３３、及び１０００ｇ／ｈａの割合で、ＨＳＴ阻害因子、例えば化合物２．３等を噴霧する。

【０１２６】

植物は、処理後１６日で、ダメージ%が評価及び評点される。

【０１２７】

【表３１】

化合物	割合 g/ha	シュードモナス HPPD	コムギ HPPD	w/t タバコ
メソトリオン	37	3	0	66
	111	3	2	57
	333	43	0	57
	1000	67	13	54
化合物2. 3	37	0	0	17
	111	3	0	40
	333	6	3	47
	1000	10	8	57

表８

ｗ／ｔタバコ植物と、シュードモナス若しくはコムギＨＰＰＤのいずれかを発現する遺伝子組換え植物との間の、処理後１６日で観察されるダメージ%の比較を示す。

【０１２８】

いずれかのＨＰＰＤ遺伝子の発現が、タバコ植物に、ＨＳＴ阻害剤の２．３やメソトリオンによる処理に対する高いレベルの抵抗性を提供することが観察される。処理されたｗ／ｔタバコ植物は、分裂組織が脱色されて白色化するが、遺伝子組換えＨＰＰＤ発現植物は緑色の健康な分裂組織及び新しい葉を有し、殆どダメージが見受けられない。この試験において、植物は、噴霧の時点で相対的に大きかったため、対照は完全に防除されなかった。

【０１２９】

実施例９

様々なヘテロ接合ＨＳＴ及びＨＰＰＤ酵素を発現し、且つそれらが重複して組み合わされて発現する遺伝子組換え植物の調製

除草剤耐性の温室試験

配列番号１１の完全長アラビドプシス（開始コドン保有）ＨＳＴを、前記の様に、二重の３５ｓ ＣＭＶプロモーター配列及びＴＭＶ翻訳エンハンサー配列の下流かつ

62

ｎｏｓ遺伝子由来の３’ターミネーターの上流にクローニングする。この発現カセットをｐＭＪＢ１（ＷＯ９８／２０１４４に記載）中にライゲーションし、そしてｐＢＩＮ１９内にライゲーションし、そして、植物形質転換に先立ち、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）株ＬＢＡ４４０４を形質転換する。上記のように、この発現コンストラクトを、バイナリーベクターにクローニングし（ｐＢＩＮ ３５Ｓアラビドプシスｈｓｔ）、これを用いてタバコ植物を形質転換して、３０～５０個の遺伝子組換え事象の集団を作成し、それらをカルスの段階で更に区分して、各遺伝子組換え「事象」から、２～４個のクローン植物を生産する。そしてそれらを再生させ、土に植え、温室に移して試験する。

【０１３０】

同様の方法で、クラミドモナスＨＳＴ遺伝子配列（ＡＭ２８５６７８）は、タバコにコドン最適化され、二重のカリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター及びタバコモザイクウイルスエンハンサー配列の下流かつｎｏｓ遺伝子ターミネーターの上流にクローニングし、これをバイナリーベクターにクローニングし、これを用いてタバコ植物を形質転換して、Ｔ０植物の集団を作成する。

【０１３１】

ＷＯ ０２／４６３８７の実施例５に記載されるのと全く同様に、コムギＨＰＰＤ遺伝子配列（Ｅｍｂｌ ＤＤ０６４４９５）は、アラビドプシスルビスコ小サブユニット（ＳＳＵ）プロモーターの下流かつｎｏｓ遺伝子ターミネーターの上流にクローニングされて「ＳＳＵコムギＨＰＰＤ ｎｏｓ発現カセット」が形成され、これを、バイナリーベクターにクローニングし、それを用いてタバコ植物を形質転換して、３０～５０個の遺伝子組換え事象の集団を作成する。

【０１３２】

ＨＳＴ及びＨＰＰＤ酵素を共に発現する植物の集団を生産するために、「ｐＢｉｎアラビドプシスＨＳＴ／コムギＨＰＰＤ」ベクターも構築される。ＳＳＵコムギＨＰＰＤｎｏｓカセット（上記）を、ｐＢｉｎ ３５Ｓアラビドプシスｈｓｔベクター（上記）のＥｃｏＲＩ部位にクローニングして、ＨＳＴ／ＨＰＰＤ発現コンストラクト及びバイナリーベクターを作成する。これを用いてタバコ植物を形質転換して、初代形質転換体の集団を作成する。

【０１３３】

あるいは、ＨＰＰＤ及びＨＳＴの両方とも発現する遺伝子組換え植物は、最初に、ヘテロ接合ＨＳＴ又はＨＰＰＤのいずれかを発現するように形質転換し、続いて生じた組織を、他方の酵素を発現するように設計されたコンストラクトを用いて形質転換することにより生産される。例えば、ＷＯ ０２／４６３８７に記載のように、タ

63

バコ植物は、アラビドプシスルビスコ小サブユニットプロモーター、ＴＭＶ翻訳エンハンサー及びｎｏｓ遺伝子３’ターミネーターの制御下で、コムギ、アベナ又はシュードモナスＨＰＰＤを発現するように形質転換される。メソトリオンに対して高度な耐性を有するＴ０事象の例示物を自家受粉させることにより、Ｔ１種子が得られる。これらのＴ１種子は、単一の事象から約１００個採取され、それらの表面を、１％Ｖｉｒｋｏｎを使用して１５分間滅菌し、そして、滅菌水中で洗浄後、２０ｇ／ｌのスクロース、１００ｍｇ／ｌのカナマイシンを含有するＭＳ培地を８ｇ／ｌのプラントアガーで固形化したＭＳ培地にプレーティングする。個々の植物を、発芽し、インビトロで成長し、クローナルな組換えシュート栽培物を生産するように微小育苗（ｍｉｃｒｏｐｒｏｐａｇａｔｅ）された、半接合及びホモ接合植物の混成集団から取り上げられる。これらのシュート栽培物の葉を、上記のコンストラクトを使用する形質転換方法及び選択方法に付する。最初に、ＨＰＰＤ及びＨＳＴの共発現がＨＰＰＤ単独の発現と比較して植物のメソトリオンに対する耐性のレベルを向上させるか否かを評価するために、ＨＰＰＤのみの形質転換体と、ＨＰＰＤ及びＨＳＴの形質転換体から調製したシュート栽培物の葉の外植片を、０．１～５ｍｇ／ｌの濃度範囲のメソトリオンを含有するＮＢＭ培地に置く。ＨＰＰＤ及びＨＳＴの形質転換体由来の外植片は、クローナルな単一の植物、ＨＰＰＤ事象に由来する材料から得た、ＨＰＰＤのみの「バックグラウンド」外植片と比較して、より高濃度のメソトリオンの下であっても、緑色のカルスを形成し、再生シュートの脱色を抑制する。

【０１３４】

「対照」植物は、単一事象の単一植物に由来する、（ＨＳＴで）形質転換されていない、ＨＰＰＤ発現クローナルバックグラウンド材料から再生される。ＨＳＴで追加で形質転換されたＴ０　ＨＳＴ遺伝子組換え小植物は、前記ハロキシジンに対する実施例において記載されるように、このバックグラウンドに対して選択され、それらも再生させられる。

小植物は、上記実施例と同様に、更なるクローンに微小育苗され、発根したものがポットに植えられ、温室中で育てられる。

【０１３５】

【表３２】

64

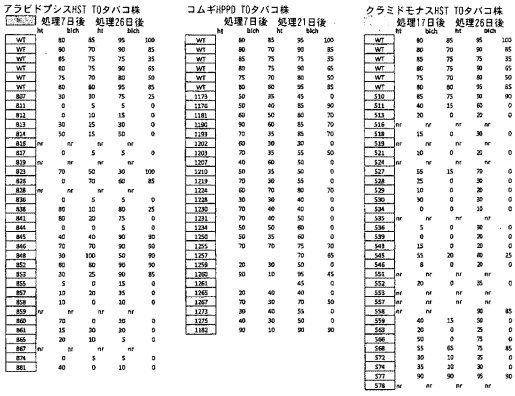


表９

タバコ事象のＴ０集団は、前記（１）３５Ｓアラビドプシスｈｓｔ遺伝子、（２）ＳＳＵコムギＨＰＰＤ遺伝子又は（３）３５Ｓクラミドモナスｈｓｔ遺伝子を有する発現カセットを択一的に保有する。除草剤ダメージの評価は、１００ｇの化合物２．３０の噴霧後の様々な時点で行われる。パラメーター「ｈｔ」は、対照植物と比較しての高さの減少％を指し、一方、パラメーター「ｂｌｃｈ」は、対照植物と比較しての分裂組織で観察される脱色の％を指す。３つのコンストラクトによる形質転換のいずれもが化合物２．３０に対する耐性を付与することは明らかである。前記２つのＨＳＴ遺伝子のいずれかで形質転換した集団において、最もダメージが少ない（矮化が３０％未満の事象が約５０％ある）最多数の植物が観察された。

【０１３６】

【表３３】

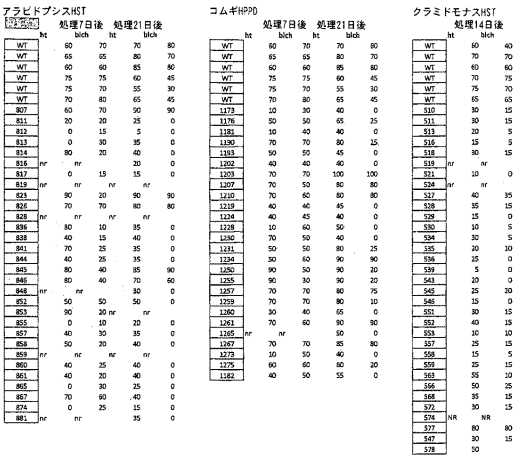


表１０

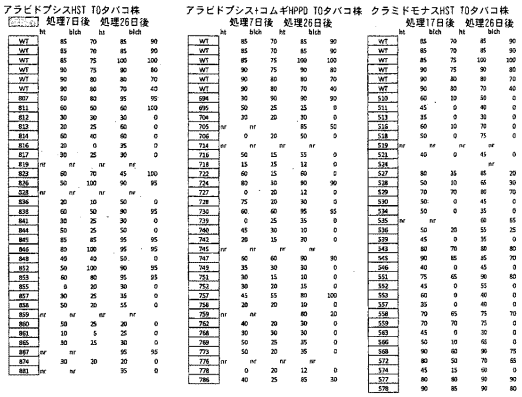
タバコ事象のＴ０集団は、前記（１）アラビドプシスＨＳＴ遺伝子、（２）コムギＨＰＰＤ遺伝子又は（３）クラミドモナスＨＳＴ遺伝子を有する発現カセットを択一的に保有する。除草剤ダメージの評価は、４０ｇの化合物１．１の噴霧後の様々な時点で行われる。パラメーター「ｈｔ」は、対照植物と比較しての高さの減少％を指

65

し、一方、パラメーター「ｂｌｃｈ」は、対照植物と比較しての分裂組織で観察される脱色の％を指す。３つのコンストラクトによる形質転換のいずれもが化合物１．１に対する耐性を提供する。前記２つのＨＳＴ遺伝子のいずれかで形質転換した集団において、最もダメージが少ない（矮化が３５％未満の事象が５０％超ある）最多数の植物が観察された。

【０１３７】

【表３４】

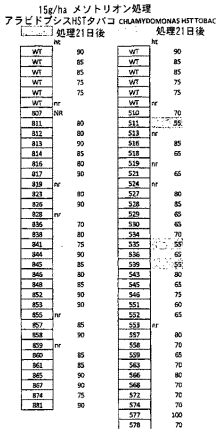


タバコ事象のＴ０集団は、前記（１）アラビドプシスＨＳＴ遺伝子、（２）アラビドプシスＨＳＴ遺伝子と重ねたコムギＨＰＰＤ遺伝子又は（３）クラミドモナスＨＳＴ遺伝子を有する発現カセットを択一的に保有する。除草剤ダメージの評価は、５００ｇの化合物２．３の噴霧後の様々な時点で行われる。パラメーター「ｈｔ」は、対照植物と比較しての高さの減少％を指し、一方、パラメーター「ｂｌｃｈ」は、対照植物と比較しての分裂組織で観察される脱色の％を指す。３つのコンストラクトによる形質転換のいずれもが化合物２．３０に対する耐性を提供する。前記ＨＰＰＤ及びＨＳＴ遺伝子の組み合わせで重ねて形質転換した植物において、最もダメージが少ない（矮化が３０％未満の事象が５０％超ある）最多数の植物が観察された。

【０１３８】

【表３５】

66



タバコ事象のＴ０集団は、前記（１）アラビドプシスＨＳＴ遺伝子、又は（２）クラミドモナスＨＳＴ遺伝子を有する発現カセットを択一的に保有する。除草剤ダメージの評価は、１５ｇ／ｈａのメソトリオンの噴霧後の様々な時点で行われる。前記クラミドモナスＨＳＴ遺伝子を保有する多くの植物株がメソトリオンに対する一定の耐性を示し、特に３つの株は、同様に処理した対照植物と比較して、顕著に良好な緑化及び回復を示した。

【０１３９】

実施例１０

ダイズ形質転換ベクターの構築

双子葉植物（ダイズ）の形質転換用のバイナリーベクターは、例えば、クラミドモナスＨＳＴコード配列（配列番号１５）の発現を駆動するアラビドプシスＵＢＱ３にＮｏｓ遺伝子３’ターミネーターを繋げて構築される。当該遺伝子は、ＨＳＴ遺伝子コード領域の推定アミノ酸配列に基づいて、ダイズでの発現用にコドン最適化されている。クラミドモナスＨＳＴ遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号５に提供されている。必要に応じて、当該形質転換ベクターは、形質転換プロセス中のグルフォシネートベースの選択のために、２つのＰＡＴ遺伝子カセット（１つは３５Ｓプロモーターを有し、１つはＣＭＰプロモーターを有し、そしていずれもｎｏｓターミネーターを付したＰＡＴ遺伝子を有する）も含む。

【０１４０】

類似のバイナリーベクター（１７１０８）も同様に構築されるが、これは、ダイズにコドン最適化されたアベナＨＰＰＤ遺伝子を発現する発現カセットも含む。この場合、ＰＡＴ遺伝子は存在せず、選択は、ＨＰＰＤ除草剤、又は、本明細書中に記載のように、ＨＳＴ除草剤を使用して得られる。

【０１４１】

実施例１１

ダイズＴ０植物の樹立及び選択

ダイズの形質転換は、当業者に周知の方法を使用して行われる。組織培養物からＴ０植物を取り、これらを、２

67

’’角型のポット中の、1%のｇｒａｎｕｌａｒ Ｍａｒａｔｈｏｎ（登録商標）（Ｏｌｙｍｐｉｃ Ｈｏｒｔｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｃｏ．， Ｍａｉｎｌａｎｄ， ＰＡ）を混合した飽和土（Ｒｅｄｉ－Ｅａｒｔｈ（登録商標） Ｐｌｕｇ ａｎｄ Ｓｅｅｄｌｉｎｇ Ｍｉｘ， Ｓｕｎ Ｇｒｏ Ｈｏｒｔｉｃｕｌｔｕｒｅ， Ｂｅｌｌｅｖｕｅ， ＷＡ）で、Ｒｅｄｉ－Ｅａｒｔｈ（登録商標）Ｍｉｘが5～10ｇ／ｇａｌのものに植え、温室に移す。植物を保湿ドームで覆い、そして、以下の：日中２４℃；夜間１８℃；明期２３時間；相対湿度８０%の環境条件に設定したＣｏｎｖｉｒｏｎ ｃｈａｍｂｅｒ（Ｐｅｍｂｉｎａ， ＮＤ）内に置く。

【０１４２】

土の中で植物が樹立されて新しい成長が認められるようになったら（１～２週間以内）、植物のサンプルを採取して、前記ＨＳＴ及び／又はＨＰＰＤ遺伝子、又はプロモーター（例えばｐｒＣＭＰ及びｐｒＵＢｑ３）の適切なプローブを使用してのＴａｑｍａｎ（商標）解析により、所望のトランス遺伝子の存在が試験される。全ての陽性の植物及び陰性の植物の幾つかを、ＭｅｔｒｏＭｉｘ（登録商標） ３８０土（Ｓｕｎ Ｇｒｏ Ｈｏｒｔｉｃｕｌｔｕｒｅ， Ｂｅｌｌｅｖｕｅ， ＷＡ）を入れた４’’角ポットに移植する。前記土には、推奨される割合で、Ｓｉｅｒｒａ１７－６－１２徐放肥料が含まれる。前記陰性の植物は、噴霧実験用の対照として扱われる。そして、前記植物を、標準的な温室に移して、１週間程度順化させる。環境条件は、日中２７℃；夜間２１℃；明期１２時間（室内光）；周囲湿度とする。順化（１週間程度）の後、植物に対して、所望の除草剤の噴霧を開始する。

【０１４３】

実施例１２

ＨＰＰＤ／ＨＳＴ除草剤混合物

少量のＨＰＰＤ阻害剤の添加の、ＨＳＴ除草剤の除草剤活性に対する影響

タバコ（サムスン種）の小植物を、無菌状態の、１／３の強度のＭｕｒａｓｈｉｇｅ ａｎｄ Ｓｋｏｏｇ塩培地で出来た、様々な量の除草剤を含む寒天中で成長させた。発芽した小植物の脱色ダメージは、処理の７日後に評価される。小植物は、透明なパースペクスに覆われ、１８℃（夜）及び２４℃（昼）、明期１６時間（～５００～９００μｍｏｌ／ｍ^2）、暗期８時間の体制で育てられる。除草剤の影響を受ける小植物は、脱色されて白色化し、成長が低下する。コルビー式を使用して、相乗的／拮抗的応答が計算される（Ｃｏｌｂｙ， Ｓ．Ｒ．（Ｃａｌｃｕｌａｔｉｎｇ ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃ ａｎｄ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｉｃ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｏｆ ｈｅｒｂｉｃｉｄｅ Ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎｓ”， Ｗｅｅｄｓ， １５， ｐ． ２０－２２， １９６７）。

68

【０１４４】

【表３６】

	% 傷害			
[ハロキシジン]/ ppm	ハロキシジン のみ	メソトリオン追加 (0.004ppm) (観察)	メソトリオン追加 (0.004ppm) (予想)	(O-E)
37.5	100	100	100	0
18.8	100	100	100	0
9.4	90	100	94	6
4.7	70	100	80	20
2.4	50	90	67.5	22.5
1.2	35	70	58	12
0.6	20	50	48	2
0.3	10	50	41.5	8.5
0.75%v/vDMSO	0	35	35	0

表１３

寒天中のタバコ苗に対する、ＨＳＴ除草剤及びＨＰＰＤ除草剤の二重施用の効果を示す。寒天中で発芽したタバコ種子を、０．００４ｐｐｍのメソトリオンの存在下又は非存在下、様々な用量のハロキシジン及び０．７５％ＤＭＳＯで処理して、その７日後に観察される脱色%を評価する。メソトリオン自体は、この用量において、通常３５%の脱色ダメージを生じるので、様々な用量のハロキシジンとの混合物におけるダメージの予想される値は、Ｃｏｌｂｙ （１９６７）により記載されるようにして計算される。

【０１４５】

他の除草剤試験の手順において、タバコ（サムスン種）の小植物を、無菌状態の、１／３の強度のＭｕｒａｓｈｉｇｅ ａｎｄ Ｓｋｏｏｇ塩培地で出来た寒天中で成長させ、その４日後に、当該小植物を、１２ウェルプレートのウェル中の２．９ｍｌの滅菌液体培養培地（３０ｍＭのスクロースを含有する半分の強度のＭｕｒａｓｈｉｇｅ ａｎｄ Ｓｋｏｏｇ培地）の表面に浮かべる。様々な用量で試験化合物を添加し、処理後１４～２０日で、脱色ダメージを評価する。前記小植物に透明なパースペクスをかぶせ、１８℃（夜）及び２４℃（昼）、明期１６時間（～５００～９００μｍｏｌ／ｍ^2）、暗期８時間の体制で育てられる。処理後１４～２０日の期間にわたり、小植物は生長を続け、新しい組織を生産するが、防除的濃度の除草剤の存在下では、脱色されており、成長も僅かである。

【０１４６】

【表３７】

	% 傷害		
化合物2.13 /ppm	化合物2.13 のみ	メソトリオン追加 (0.001ppm)	メソトリオン追加 (0.0005ppm)
23	100	100	100
7.67	50	100	100
2.56	0	90	90
0.85	0	90	40
0.28	0	80	0
0.09	0	80	0
0.03	0	60	0
0.01	0	40	0
0.75%v/vDMSO	0	20	0

表１４

液体上で育ったタバコ苗に対する、ＨＳＴ除草剤及びＨ

69

ＰＰＤ除草剤の二重施用の効果を示す。液体培養培地上で発芽したタバコ種子を、０．００１又は０．０００５ｐｐｍのメソトリオンの存在下又は非存在下、様々な濃度のＨＳＴ除草剤の化合物２．１３及び０．７５％　ｖ／ｖ　ＤＭＳＯで処理して、その２０日後に観察される脱色％を評価する。

これらのメソトリオンの用量では、単独で施用する場合は最小で、それぞれ２０％、又は０％の脱色ダメージしか生じない。

【０１４７】

得られたデータから、低用量のメソトリオンの添加が、ＨＳＴ阻害剤のハロキシジンの、寒天上で育ったタバコ植物に対する除草効果において、相乗効果を生じることが明らかになる。

【０１４８】

【表３８】

ハロキシジン ppm	ハロキシジンのみ	+メソトリオン 0.001ppm
47	100	100
16	100	100
5.2	100	100
1.7	100	100
0.58	90	100
0.19	50	100
0.75%DMSO	0	5

表15a

化合物2.15ppm	化合物2.15のみ	+メソトリオン 0.001ppm
47	100	100
16	100	100
5.2	40	70
1.7	5	80
0.58	0	5
0.19	5	0
0.75%DMSO	0	5

表15b

表１５ａ及び１５ｂ

液体培養培地上で育てたタバコの苗に対する、ＨＳＴ除草剤及びＨＰＰＤ除草剤の二重施用の傷害効果を示す。液体培養培地上で発芽したタバコ種子を、０．００１ｐｐｍのメソトリオンの存在下又は非存在下、様々な濃度のＨＳＴ除草剤の、ハロキシジン（表１５ａ）及び化合物２．１３（表１５ｂ）、並びに０．７５％　ｖ／ｖ　ＤＭＳＯで処理して、その１４日後に観察される脱色％を評価する。かかるメソトリオンの用量では、最小（０～５％ｖ）のダメージしか生じない。

【０１４９】

液体培養において、ＨＳＴ阻害剤の２．１３の活性に対するメソトリオンの相乗効果は、ハロキシジンの活性に対する場合よりも更に明確になる。一定の用量のメソトリオンの添加自体は何ら顕著なダメージを生じるものではないが、予想される防除レベル（Ｃｏｌｂｙにより）が０％、０％及び５０％に過ぎない用量の化合物２．１３の脱色傷害を、４０％、９０％及び１００％に至らしめる。同様に、類似する条件で、及び反復実験において、少量のメソトリオンが、ハロキシジン及び化合物２．１５の用量依存的傷害に対して、相乗効果を有することが明らかになっている。

【０１５０】

70

実施例１３

ＨＳＴ及びＨＰＰＤ除草剤の混合物による、温室中の雑草の防除

雑草の種を、適切な土（例えば５０％ピート、Ｊｏｈｎ　Ｉｎｎｅｓ　ｓｏｉｌ　ｎｏ３）を入れたトレイに植え、日中２４～２７℃；夜間１８～２１℃、及び明期が約１４時間（ＵＫの夏季、又はこれより長い）の条件の温室中で育てる。湿度は～６５％で、明度は、ベンチレベルで最大２０００μｍｏｌ／ｍ^2 である。０．２～０．２５％のＸ－７７界面活性剤を含む水に溶かした試験化合物をトレイに噴霧し、そして、適切なトラックスプレーヤー（例えば植物の頂点から約２インチの高さにノズルを備えたＤｅＶｒｉｅｓスプレーチャンバー）中を約２ｍｐｈで移動する、適切なトラックスプレーヤー上のブームから噴霧される。スプレー体積は適切には、５００～１０００ｌ／ｈａである。噴霧は、発芽前に、及び発芽して約７～１２日後の小植物に対して、両方の時点で行われる。

【０１５１】

植物は、処理後１４日で評価され、除草剤ダメージは、０～１００％のスケールで評点される。ＨＳＴ阻害剤の化合物２．３０（表１６及び１７で化合物Ａと表記されている）、ハロキシジン（化合物１．１）及び化合物２．１３（表１６及び１７で化合物ＡＥと表記されている）を、０～５００ｇ／ｈａの割合で噴霧する。メソトリオンは、１ｇ／ｈａの非常に低い割合で施用され、斯かる濃度では、本質的にはダメージを生じない（＜１０％ダメージ）。

【０１５２】

【表３９】

発芽後の施用		SETFA			ECHCG			ALOMY		
a.i.	割合 g/ha	メソトリオン無し	1 g ai/ha メソトリオン	コルビー	メソトリオン無し	1 g ai/ha メソトリオン	コルビー	メソトリオン無し	1 g ai/ha メソトリオン	コルビー
メソトリオン	1		0			8			0	
化合物 A	500	70	75	*5*	67	75	*6*	23	35	*12*
	250	65	75	*10*	65	68	*0*	15	22	*7*
	125	57	62	*5*	57	53	*-7*	13	20	*7*
	63	33	42	*8*	42	42	*-5*	5	10	*5*
	31	32	42	*10*	18	38	*13*	3	3	*0*
	16	23	18	*-5*	12	17	*-2*	2	2	*0*
化合物 AE	500	0	0	*0*	0	20	*12*	7	5	*-2*
	250	0	0	*0*	0	22	*13*	2	3	*2*
	125	0	0	*0*	0	15	*7*	0	0	*0*
	63	0	0	*0*	0	8	*0*	0	3	*3*
	31	0	0	*0*	0	5	*-3*	0	2	*2*
	16	0	0	*0*	0	5	*-3*	0	0	*0*
ハロキシジン	500	100	100	*0*	98	100	*2*	95	95	*0*
	250	100	100	*0*	83	97	*12*	90	92	*2*
	125	93	97	*3*	70	78	*6*	78	83	*5*
	63	80	92	*12*	57	75	*15*	53	68	*15*
	31	68	82	*13*	52	67	*11*	27	33	*7*
	16	42	27	*-15*	33	57	*18*	13	23	*10*

表１６

ＨＳＴ／ＨＰＰＤ除草剤混合物による雑草の発芽後の防除を示す。記載の数字は、観察されたダメージ％に対応する。

【０１５３】

【表４０】

71

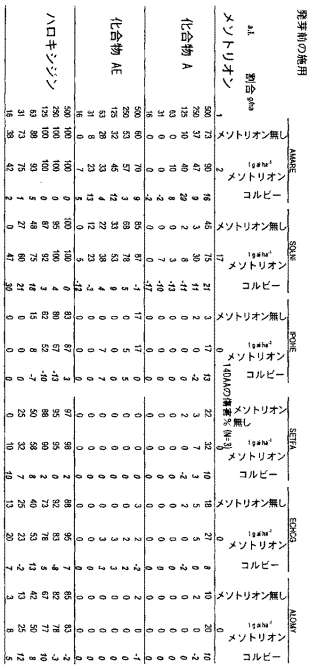


表１７

ＨＳＴ／ＨＰＰＤ除草剤混合物による雑草の発芽前の防除を示す。

【０１５４】

実施例１４

ＨＰＰＤ及びＨＳＴ除草剤の間の相乗作用を示す更なる研究

表１８及び１９に結果を描写する更なる試験において、雑草の種子を、５０％ピート／Ｊｏｈｎ　Ｉｎｎｅｓ　ｓｏｉｌ　ｎｏ　３を入れたトレイに植え、日中２４～２７℃；夜間１８～２１℃、及び明期が約１５時間の温室中で育てる。湿度は～６５％で、明度は、ベンチレベルで最大２０００μｍｏｌ／m^2 である。再び、噴霧化合物を０．２％のＸ７７界面活性剤に溶かし、これが、植物の頂点から約２インチの高さにノズルを備えた２ｍｐｈで移動するトラックスプレーヤー上のブームから噴霧される。噴霧体積は、５００ｌ／ｈａである。噴霧は、発芽前、及び小植物が発芽してから約７～１２日後の両方において実行される。植物は、処理の１４日後、０～１００％のスケールで評点される除草剤ダメージにより評価される。ＨＰＰＤ阻害除草剤は、化合物Ａ２２（４－ヒドロキシ－３－［［２－（２－メトキシエトキシ）メチル］－６－（トリフルオロメチル）－３－ピリジニル］カルボニル］－ビシクロ［３．２．１］オクト－３－エン－２－オン）であり、単独で、及び様々なＨＳＴ除草剤との混合物として、いずれも２ｇ／ｈａで噴霧される。

結果及び噴霧率を、表１８及び１９に描写する。ここでも、Ｃｏｌｂｙ式を使用して、前記混合物を用いた処理の後に観察された相乗スコアを、各成分を単独で用いた

72

場合の結果を基準として計算した。正の相乗効果は、ＨＰＰＤ除草剤と広範なＨＳＴ阻害剤除草剤とを、発芽前及び発芽後の両方において、様々な雑草に施用するときに観察される。

【０１５５】

【表４１】

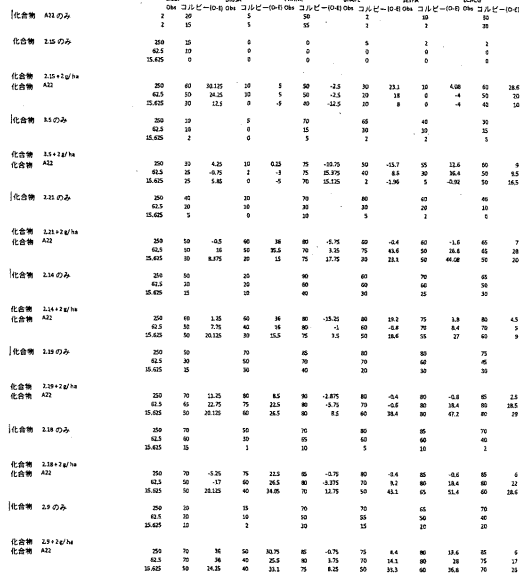


表１８

様々な雑草の、発芽後の雑草防除を示す。様々なＨＳＴ阻害剤を単独で、及びＡ２２との混合物として噴霧した後、防除％を評点する（単発試験のみ）。

【０１５６】

【表４２】

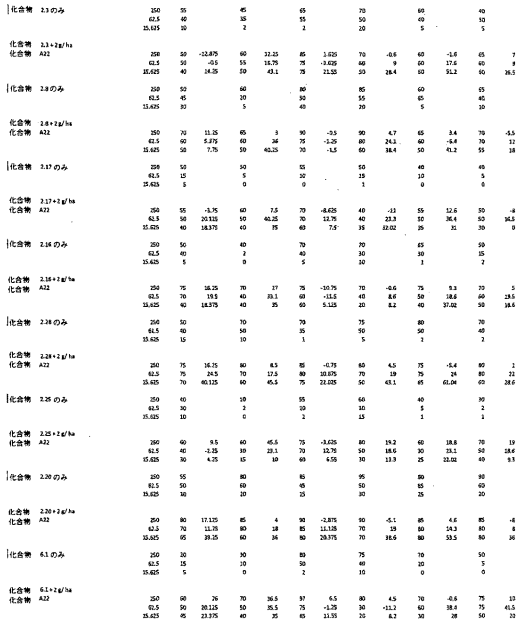


表１８（続き）

73

様々な雑草の、発芽後の雑草防除を示す。様々なＨＳＴ阻害剤を単独で、及びＡ２２との混合物として噴霧した後、防除%を評点する（単発試験のみ）。

【０１５７】

【表４３】

化合物	割合 (g/ha)	発芽前処理の14日後の評点 SIDSP Obs	ORYSA コルビー(O-E) Obs	コルビー(O-E) Obs	PANMI コルビー(O-E) Obs	コルビー(O-E) Obs	BRAPL コルビー(O-E) Obs	コルビー(O-E) Obs	SETFA コルビー(O-E) Obs	コルビー(O-E) Obs	ECHCG コルビー(O-E)
化合物 A22のみ		2	2		2		0	2	5	5	
		2	0		0		0	0	0	0	
化合物 2.15 のみ		250	0		0		0	0	0	0	
		62.5	0		0		0	0	0	0	
		15.625	0		0		0	0	0	0	
化合物 2.15＋2g/ha											
化合物 A22											
		250	2	1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	10	27.5
		62.5	2	1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	10	17.5
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	0	-2.5
化合物 3.5 のみ		250	2		0		0		0		0		0	
		62.5	0		0		0		0		0		0	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 3.5＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	3	2.02	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	2	-0.5
		62.5	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	2	-0.5
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	0	-2.5
化合物 2.21 のみ		250	1		0		0		5		2		5	
		62.5	0		0		0		2		0		0	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 2.21＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	10	8.01	65	64	15	15	10	5	10	5.55	30	22.625
		62.5	0	-1	0	-1	0	0	0	-2	1	-1.5	0	-2.5
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	0	-2.5
化合物 2.14 のみ		250	5		5		2		20		20		50	
		62.5	0		0		0		2		2		5	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 2.14＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	50	44.05	30	24.05	50	48	30	10	40	18	97	45.75
		62.5	0	-5	0	-1	0	0	10	8	20	15.55	60	52.625
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	25	17.5
化合物 2.19 のみ		250	10		20		60		40		60		90	
		62.5	2		0		0		10		5		50	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 2.19＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	65	54.1	80	59.2	65	5	70	30	70	9	88	-10.25
		62.5	65	62.02	30	29 NC	NC		20	10	5	-2.375	60	8.75
		15.625	30	29	2	1	2	2	0	0	2	-0.5	10	7.5
化合物 2.18 のみ		250	30		0		50		40		75		20	
		62.5	30		0		0		10		38		20	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 2.18＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	60	29.3	30	29	65	15	60	20	60	33.125	88	58
		62.5	20	-10.7	10	9	0	0	5	-5	2	-20	2	-20
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	1	-1.5	0	-2.5
化合物 2.9 のみ		250	60		65		60		50		30		60	
		62.5	0		9		0		2		0		0	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物 2.9＋2g/ha														
化合物 A22														
		250	40	-0.6	50	-15.35	35	-25	50	0	60	28.25	90	39
		62.5	2	1	1	0	0	0	2	0	20	17.5	75	72.5
		15.625	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	60	57.5

表１９

様々な雑草の、発芽前の雑草防除を示す。様々なＨＳＴ阻害剤を単独で、及びＡ２２との混合物として噴霧した後、処理後１４日における防除%を評点する。

【０１５８】

【表４４】

74

化合物	2.3 のみ	250	20		40		10		40		30		50	
		62.5	0		0		0		2		5		10	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	2.3＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	5	-15.8	10	-30.6	20	-30	20	-20	40	8.25	80	28.75
		62.5	0	-1	5	4	0	0	10	8	30	22.625	70	57.75
		15.625 NC	NC		0	-1	0	0	0	0	20	17.5	30	27.5
化合物	2.8 のみ	250	2		30		60		15		10		50	
		62.5	0		0		0		1		0		2	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	2.8＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	2	-0.98	2	-28.7	5	-55	20	5	30	17.75	60	8.75
		62.5	2	1	1	0	0	0	20	10	30	27.5	55	50.35
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	10	7.5	40	37.5
化合物	2.17 のみ	250	0		0		0		2		10		10	
		62.5	0		0		0		0		0		0	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	2.17＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	2	1	1	0	0	0	10	8	60	37.75	60	47.75
		62.5	0	-1	0	-1	0	0	0	0	1	-0.5	2	-0.5
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	1	-1.5	1	-1.5
化合物	2.16 のみ	250	0		0		40		50		45		60	
		62.5	0		0		0		5		10		15	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	2.16＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	2	1	10	9	40	0	35	-15	30	-16.375	50	-13
		62.5	5	4	15	14	0	0	2	-3	10	-2.25	20	2.875
		15.625	0	-1	0	-1	1	1	0	0	5	2.5	25	22.5
化合物	2.38 のみ	250	10		30		60		50		60		80	
		62.5	0		0		0		2		25		50	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	2.38＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	20	9.1	30	-0.7	55	-5	60	10	70	9	97	16.5
		62.5	1	0	15	14	5	5	10	8	15	-11.875	20	-21.25
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	2	2	10	7.5	20	17.5
化合物	2.35 のみ	250	2		5		10		20		15		30	
		62.5	1		0		0		2		1		0	
		15.625	0		0		0		0		4		0	
化合物	2.35＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	10	7.01	0	-5.95	10	0	40	10	15	-2.125	30	-1.75
		62.5	0	-1.99	0	-1	0	0	5	3	15	11.525	40	37.5
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2.5	0	-2.5
化合物	2.30 のみ	250	5		20		30		60		65		90	
		62.5	0		0		2		10		20		15	
		15.625	0		0		0		0		0		1	
化合物	2.30＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	5	-0.95	10	-10.8	50	20	60	0	45	-20.875	85	-5.25
		62.5	5	4	2	1	0	-2	20	10	60	28	85	67.875
		15.625	0	-1	10	9	0	0	2	2	10	7.5	20	16.525
化合物	6.1 のみ	250	0		2		40		10		20		60	
		62.5	0		0		0		0		2		1	
		15.625	0		0		0		0		0		0	
化合物	6.1＋2g/ha													
化合物	A22													
		250	80	79	60	77.01	80	40	97	87	98	76	85	74
		62.5	10	9	40	39	20	20	10	10	15	10.55	30	26.125
		15.625	0	-1	0	-1	0	0	20	20	30	27.5	50	47.5

表１９（続き）

様々な雑草の、発芽前の雑草防除を示す。様々なＨＳＴ阻害剤を単独で、及びＡ２２との混合物として噴霧した後、処理後１４日における防除%を評点する。

【０１５９】

以上の表に提示するデータは、メソトリオンの添加が、低（致死未満）レベルであっても、発芽前及び発芽後の両方において、ＨＳＴ阻害除草剤による雑草防除を改善することを示唆している。

【配列表】
0005770631000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ０１Ｎ	*43/58*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｎ	43/90	１０４
Ａ０１Ｎ	*43/653*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｎ	43/58	Ｄ
Ａ０１Ｎ	*47/36*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｎ	43/653	Ｎ
Ａ０１Ｎ	*57/20*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｎ	47/36	１０１Ｅ
Ａ０１Ｐ	*13/00*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｎ	57/20	Ｇ
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｐ	13/00	
			Ｃ１２Ｎ	5/00	１０３

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
(72)発明者 ホークス，ティモシー ロバート
イギリス国，バークシャー，ブラックネル，ジェロッツ ヒル インターナショナル リサーチ センター，シンジェンタ リミテッド
(72)発明者 ドライトン，ポール リチャード
イギリス国，バークシャー，ブラックネル，ジェロッツ ヒル インターナショナル リサーチ センター，シンジェンタ リミテッド
(72)発明者 デール，リチャード
イギリス国，バークシャー，ブラックネル，ジェロッツ ヒル インターナショナル リサーチ センター，シンジェンタ リミテッド

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第０３／０４７５４７（WO，Ａ１）
国際公開第２００８／０１３９０４（WO，Ａ１）
TIAN LI，THE PDS2 MUTATION IS A LESION IN THE ARABIDOPSIS HOMOGENTISATE 以下備考，PLANTA，２００７年 ９月，V226 N4，P1067-1073，SOLANESYLTRANSFERASE GENE INVOLVED IN PLASTOQUINONE BIOSYNTHESIS
植物の生長調節，２００２年，Vol．37，No．2，p．146-155

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ａ０１Ｈ ５／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＣｉＮｉｉ
ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）